Faculté de Médecine Necker-Enfants malades

BACTERIOLOGIE GENERALE

2002/2003 P.C.E.M. 2

Table des auteurs

Responsable d'enseignement : Pr. P. BERCHE

Qu'est-ce qu'un agent pathogène ?
P. Berche

Le conflit hôte-bactérie
P. Berche

Survie des bactéries extracellulaires : toxines bactériennes et variation antigénique
P. Berche

Parasitisme intracellulaire
P. Berche

Mutations bactériennes
S. Kayal

Eléments génétiques mobiles
C. Poyart

Transfert de l'information génétique
C. Poyart

Origine et évolution de la résistance aux antibiotiques
C. Poyart

Résistance des bactéries aux antibiotiques
C. Poyart

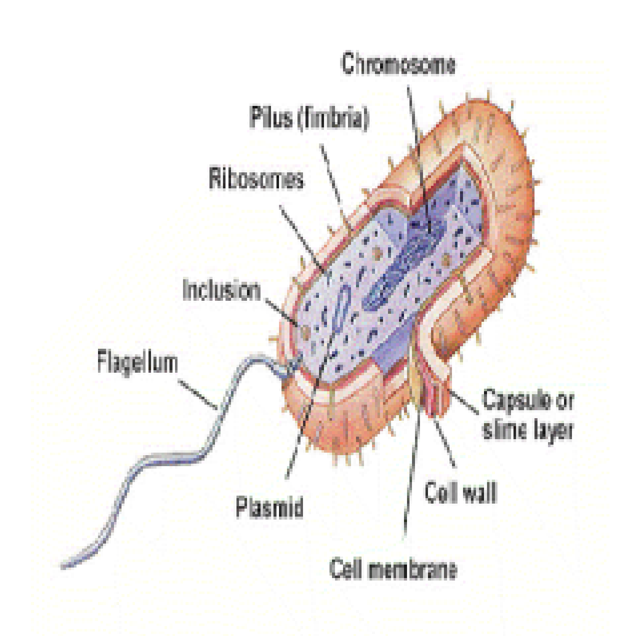
Impact de la génomique pour le diagnostic et le traitement des infections bactériennes
X. Nassif

Prions
P. Berche

Qu'est-ce qu'un agent pathogène ?

Qu'est ce qu'une bactérie ?

Les bactéries sont des organismes procaryotes sans noyau différencié, sans mitochondries, avec un génome habituellement circulaire formé d'une double hélice de DNA codant le plus souvent pour 1000 à 4000 gènes, avec une paroi rigide formée de peptidoglycane. Les eucaryotes ont un noyau avec une membrane nucléaire, des mitochondries, des organelles intracellulaires (Golgi, réticulum endolasique…).



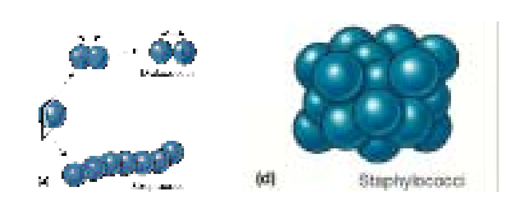
Morphologie des bactéries

Les bactéries sont vues au microscopie optique, vivantes à l'état frais (lumière blanche, fond noir, contraste de phase), ou après colorations (Bleu, Gram , Ziehl-Neelsen pour les mycobactéries), et au microscope électronique à transmission ou à balayage.

Forme, taille et propriétés tinctoriales des bactéries

Les bactéries ont une taille moyenne de 0.5 - 2.0 µm de large et 2-6 µm de long, parfois beaucoup plus (une hématie mesure 8µm de diamètre). Les bactéries ont des formes très variées : coques (diplocoques, amas, chaînettes) ; bacilles (droits, incurvés, spiralés). Ces formes sont dues à la structure de la paroi (peptidoglycane) et au mode de septation propre à chaque espèce bactérienne.

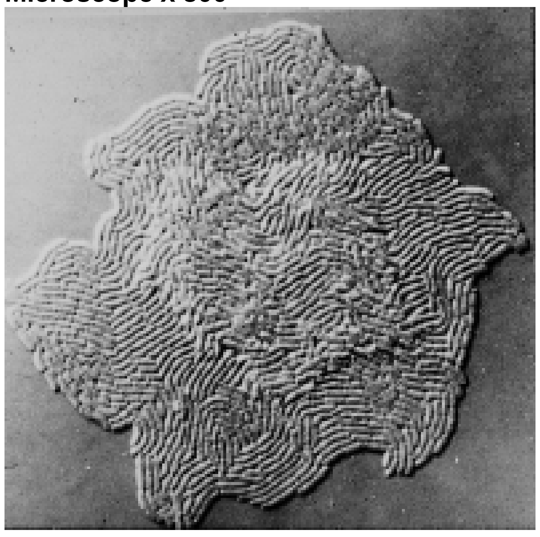
Exemple de multiplication des coques en chaînettes et en amas



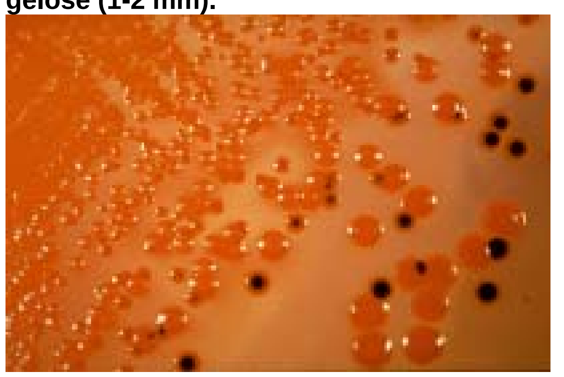
D'après la coloration de Gram, on distingue selon les propriétés tinctoriales les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif : les Gram + sont décolorés par l'alcool, les Gram négatif ne le sont pas. Les mycobactéries sont un groupe à part appartenant aux bactéries à Gram positif mais non colorés par la coloration de Gram du fait de leur paroi très particulière. Cette distinction par la coloration de Gram est très pratique car elle correspond à des différences notables dans la structure de la paroi et à une réalité phylogénique : les bactéries à Gram positif sont apparues d'abord au cours de l'Evolution, puis par l'apport d'une enveloppe externe les bactéries ont acquis de nouvelles propriétés tinctoriales (bactéries à Gram négatif). De plus, elle correspond à une réalité thérapeutique : les antibiotiques actifs ne sont pas mes mêmes selon qu'il s'agit d'une bactéries Gram+ , Gram – ou d'une mycobactérie.

Après croissance sur milieu de culture nutritif acellulaire, les bactéries donne en quelques heures ou jours (bactéries à croissance rapide) ou en quelques semaines (bactéries à croissance lente) des colonies visibles à l'œil nu. Ces colonies sont constituées de 1-2 milliards de bactéries et proviennent d'une seule bactérie clones). L'aspect, la pigmentation, la taille, la forme et le temps d'apparition de ces colonies sont des propriétés utilisées pour identifier les espèces bactériennes.

Colonie de *E coli* après 2 h d'incubation Microscope x 500

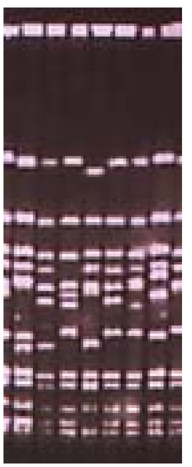


Colonies de *E coli* et *Salmonella* après 24h sur gélose (1-2 mm).



Le génome des bactéries

Le noyau des bactéries est constitué d'un chromosome sans membrane nucléaire.
Ce chromosome est habituellement circulaire et unique. Il peut être étudié par l'établissement de cartes génétiques selon la disposition des gènes, de cartes physiques par PFGE (*Pulsed-Field Electrophoresis Gel*) et par séquençage du génome bactérien.



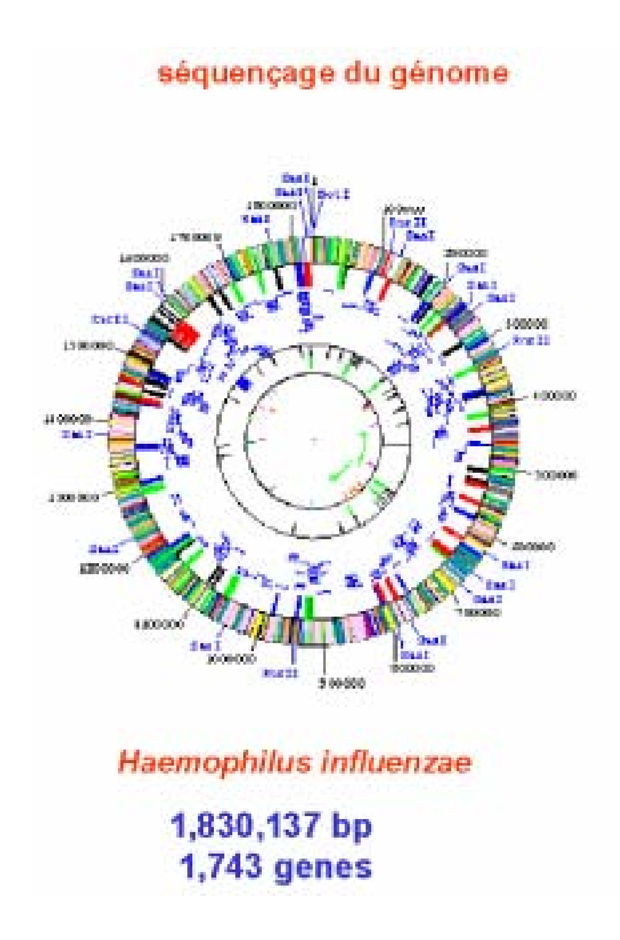
PFGE du chromosome de souches actérienes (fragments de 50 kb à 500 kb).

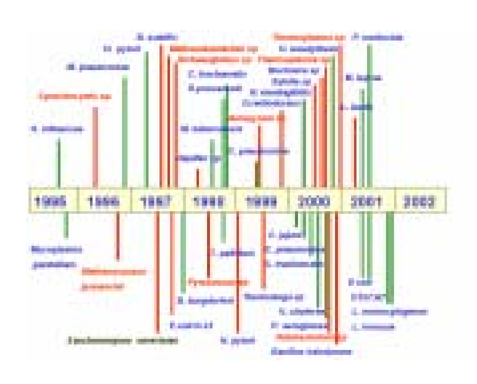
Taille du génome bactérien

La taille du chromosome bactérien est variable, de 600 kb (*Mycoplasma genitaium*) et 8000 kb *Streptomyces*), en moyenne 3000-4000 kb (>3000 gènes), parfois associé à des plasmides qui sont des petits chromosomes circulaires à réplication autonome (10-200 kb). Les plus petits génomes sont retrouvés chez les bactéries très inféodées à leurs hôtes, telles que les mycoplasmes ou les bactéries intracellulaires strictes (*Chlamydia* , *Rickettsia*), les bactéries très adaptées à leur hôte (*Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, ,*Mycobacterium leprae*…). Les bactéries avec un grand génome sont souvent saprophytes et ubiquistes(*Entero-bacteriacae, Bacillus* …). Par exemple, la taille du génome de *E. coli* est de 4,7 Mb – 5,2 Mb selon les souches.



Chromosome après lyse bactérienne





Génomes	taille	N° gènes
φX174	5,386 kb	
λ	4,8502 kb	
CMVH	22,935 kb	
H influenzae	1.82 Mb	1727
M genitalium	0.58 Mb	482
E coli	4.72 Mb	4307
S cerevisiae	12.5 Mb	6000
C elegans	100 Mb	13100
A thaliana	150 Mb	20000
Oryza sativa(riz)	430 Mb	30000
Sorghum bicolor	760 Mb	30000
Zea mays (maïs)	2800 Mb	30000
H sapiens	3000 Mb	30000
Triticum aestivum(blé)	16000 Mb	30000

Topologie du génome bactérien

Les chromosomes sont habituellement circulaires et uniques. Cependant, quelques bactéries ont 2 ou même 3 chromosomes : *Brucella melitensis* 2 ; *Rhodobacter sphaeroides* 2 ; *Vibrio cholerae* 2; *Rhizobium melitoti* 3 ; *Bulkolderia cepacia* 3 ; *Agrobacterium tumefaciens* 2 (1 circulaire, 1 linéaire). Certaines rares bactéries ont un chromosome linéaire : *Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces*,*Rhodococcus*, *Agrobacterium tumefaciens*. La signification biologique de ces particularités en termes est inconnue.

Organisation du génome bactérien

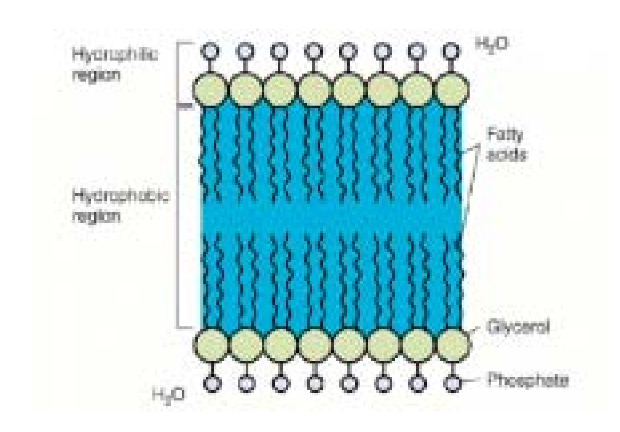
Le chromosome bactérien est constitué de nombreux gènes de structure et de gènes régulateurs organisés en opérons, de gènes répétés (par exemple l'opéron ARNr : *E.coli* 7 copies, *B. subtilis* 10 copies, *M. tuberculosis* 1 copie), d' éléments mobiles (transposons, intégrons, prophages, séquences IS d'insertion…) et de séquences non-codantes qui ne représentent que 5 - 10% du chromosome. Le chromosome bactérien a une certaine plasticité qui lui permet de perdre ou acquérir au cours du temps de nouveaux gènes codant pour codant pour des résistances aux antibiotiques et des facteurs de virulence par transformation, conjugaison ou transduction de phages, ou d'être le siège de réarrangements qui remodèlent le génome ou font varier son expression (variation antigénique…). Dans une espèce bactérienne donnée, la variabilité génétique peut atteindre 10% - 20% du génome. Une espèce est distinguée d'une autre par un taux d'hybridation DNA-DNA inférieur à 70%.

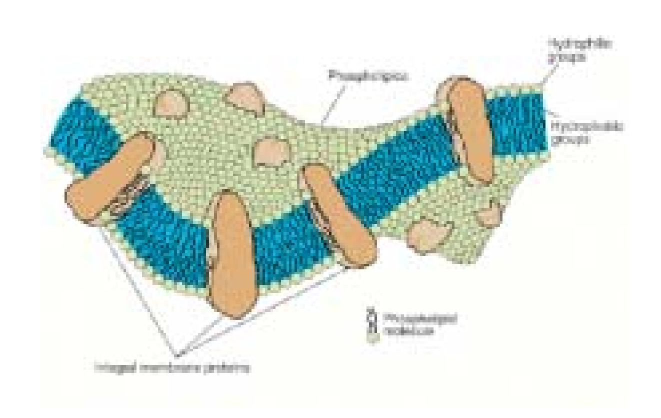
De nombreux génomes bactériens sont maintenant entièrement séquencés depuis 1995. Pour les pathogènes, on peut citer Haemophilus influenzae , Mycoplasma pneumoniae ,Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis, Borrelia burgdorferi ,Treponema pallidum ,Vibrio cholerae ,Neisseria meningitidis, E coli O157:H7, Listeria monocytogenes, Ureaplasma urealyticum, Pasteurella multocida, Mycobacterium leprae, Rickettsia prowazecki, Chlamydia trachomatis,

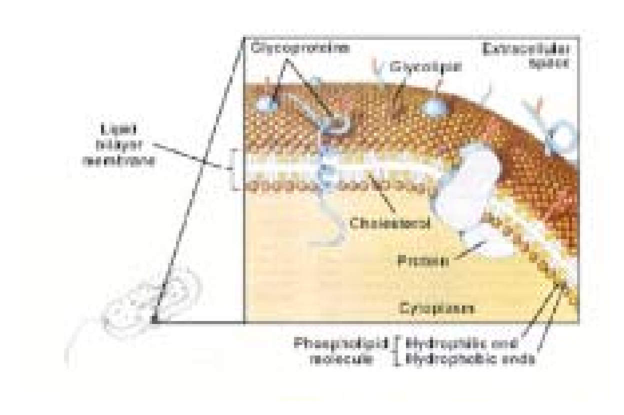
Chlamydia pneumoniae, Campylobacter jejuni, Pseudomonas aeruginosa

Le cytoplasme des bactéries

Le cytoplasme bactérien est constitué de ribosomes et les nombreuses protéines cytoplasmiques (enzymes métaboliques, protéines chaperons et protéines de structures…) sans organelles. Il peut contenir des granulations de réserve (glycogène, polyphosphates, β-hydroxybutyrates…). Il est délimité par une membrane cytoplasmique constituée, comme celle des eucaryotes, d'une bicouche lipidique avec des protéines transmembranaires ou exposées : des perméases pour les substrats nutritionnels, des enzymes de synthèse du peptidoglycane (*Penicillin-Binding Proteins* PBPs), des enzymes respiratoires (deshydrogénases, cytochromes…).





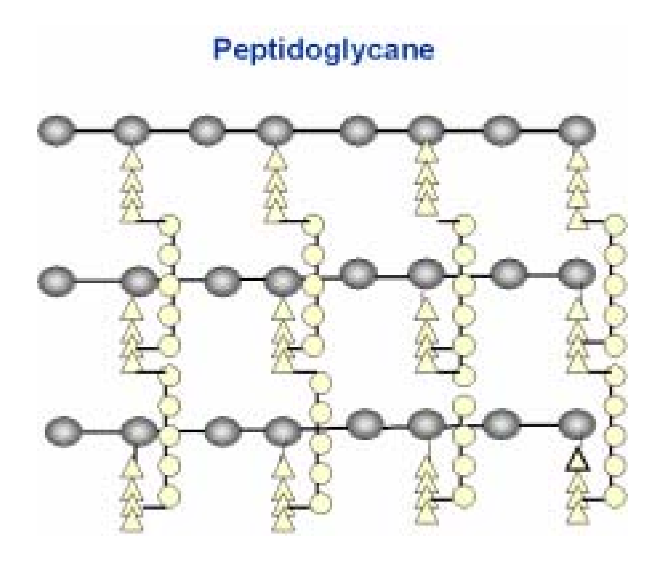


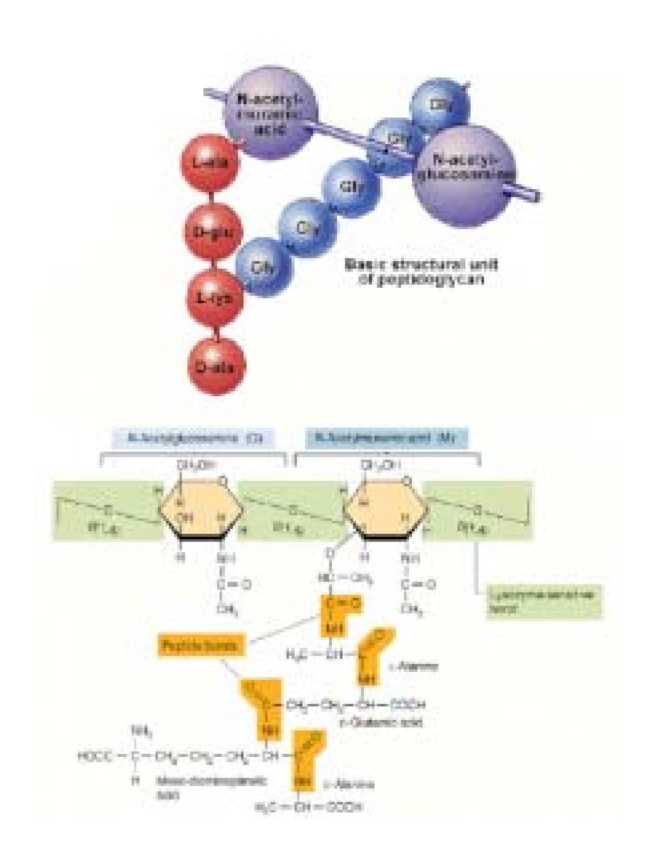
Les constituants de la paroi des bactéries

La paroi des bactéries est constituée d'un peptidoglycane uniquement retrouvé chez les bactéries et présent dans l'ensemble du monde bactérien (à quelques exceptions, telles que les mycoplasmes ou mollicutes, bactéries sans peptidoglycane).

Le peptidoglycane

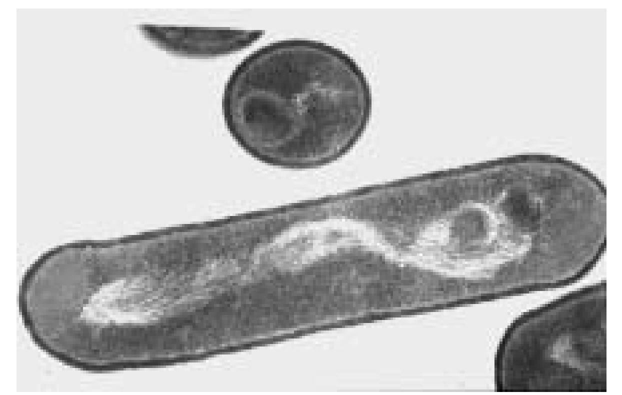
Le peptidoglycane est un polyoside d'unités répétitives d'acide N-acétyl-muramique et de N-acétyl-glucosamine, sur lesquels sont branchés des chaînes courtes pentapeptidiques, donnant une structure tridimentionnelle en réseau compact. Ce polymère complexe est synthétisé par des enzymes ou PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*). Ce sont des transpeptidases , des carboxypeptidases, des amidases (autolysines) qui sont la cible des pénicillines.



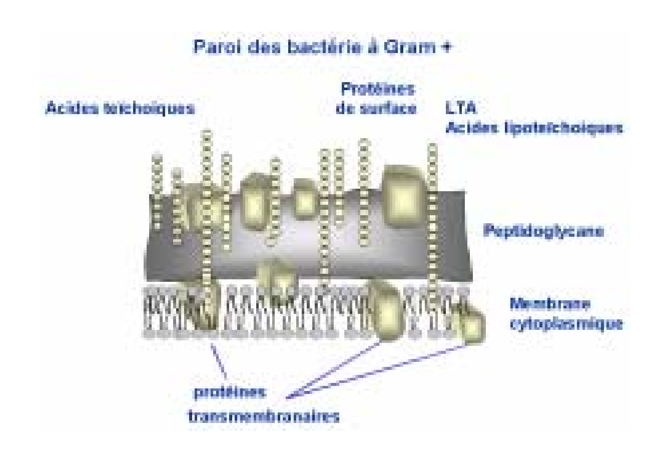


La paroi des bactéries à Gram positif

La paroi des bactéries conditionne la forme des bactéries et constitue une protection très efficace contre un environnement hostile et très changeant (osmolarité, température, radiations ionisantes, sécheresse…). Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques…).



Bacilles à gram positif

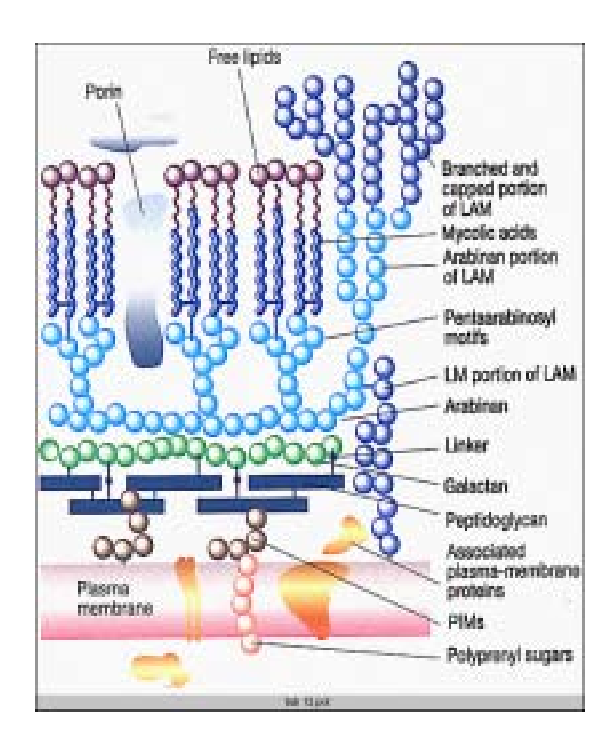


La paroi des mycobactéries

Les mycobactéries ont la structure des bactéries à Gram positif, sans enveloppe externe, avec des polyosides pariétaux impliqués dans leur structure, l’arabino-galactane et le lipoarabinomannane , et une grande richesse en acides gras , les acides mycoliques qui tapissent la surface de ces bactéries. Cette paroi complexe confère une grande résistance dans l’environnement et à la digestion par les macrophages.

Mycobacterium leprae



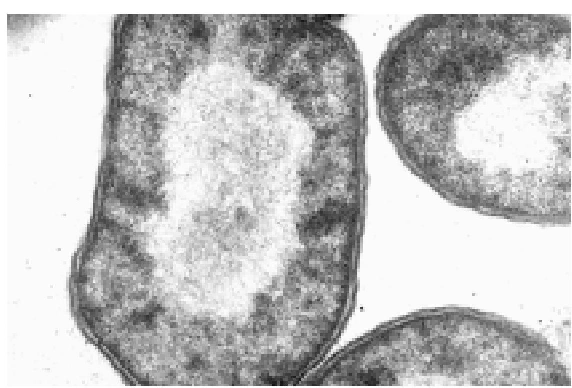


Les acides lipotéichoïques et les acides lipotéichoïques

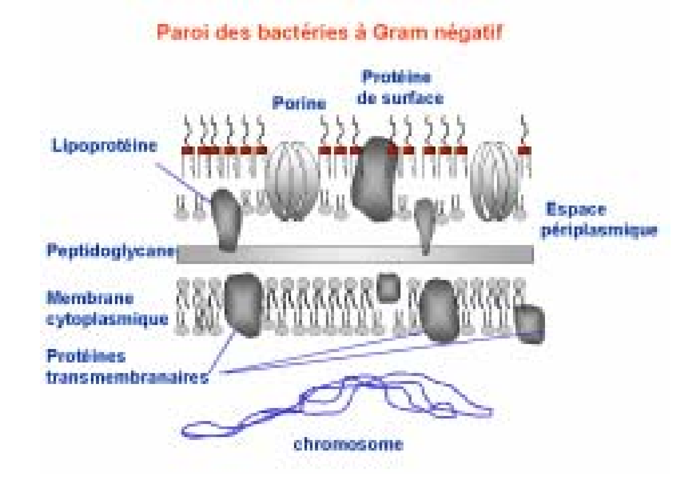
Ce sont des polymères ne sont retrouvés que chez les bactéries à Gram positif. Les acides lipotéichoïques (LTA) sont des polyribitol-phosphates enchâssés aux acides gras de la membrane cytoplasmique et traversant la paroi. Ils auraient un rôle régulateur de la fonction des autolysines indispensables à la bactéricidie et un rôle d'adhésine. Les acides téichoïques sont des polyosides formés de polyols (ribitol, glycérol…) et de phosphates attachés de façon covalente à l'acide muramique du peptidoglycane, avec une forte charge négative. Ces polyosides aurait un rôle régulateur dans le passage des cations (Mg++).

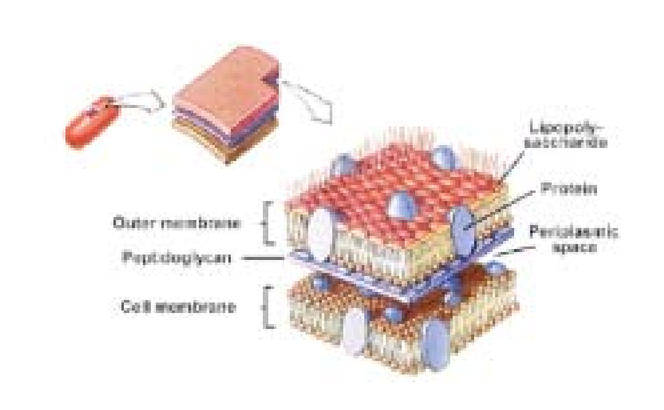
La paroi des bactéries à Gram négatif : l'enveloppe externe

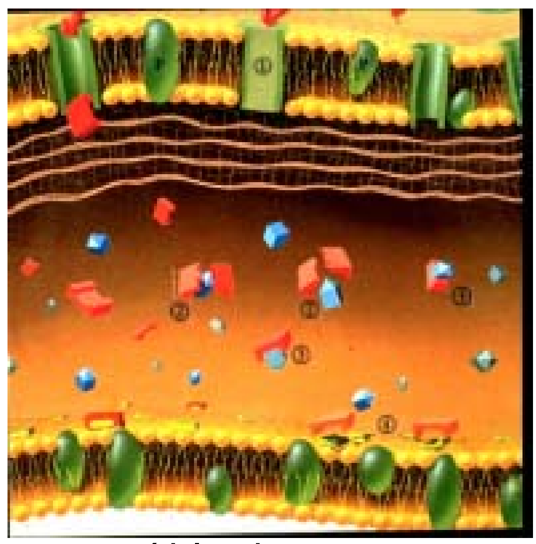
Chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines…) et de lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est le ''ventre '' des bactéries, rempli d'enzymes qui dégradent les substrats complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds…).



Bacilles Gram négatif (coupe)



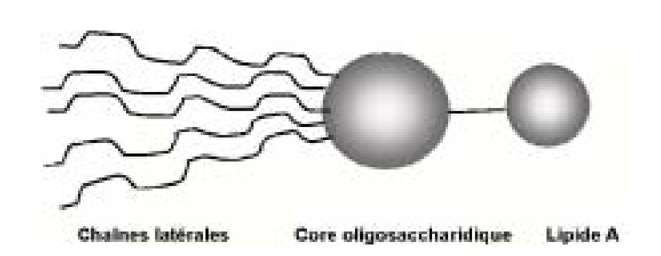


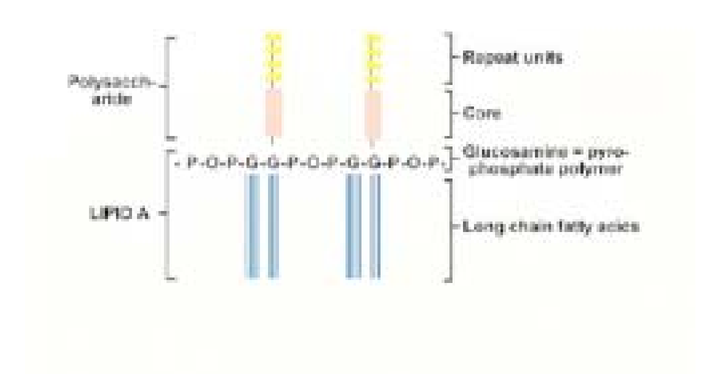


L'espace périplasmique

Le lipopolysaccharide

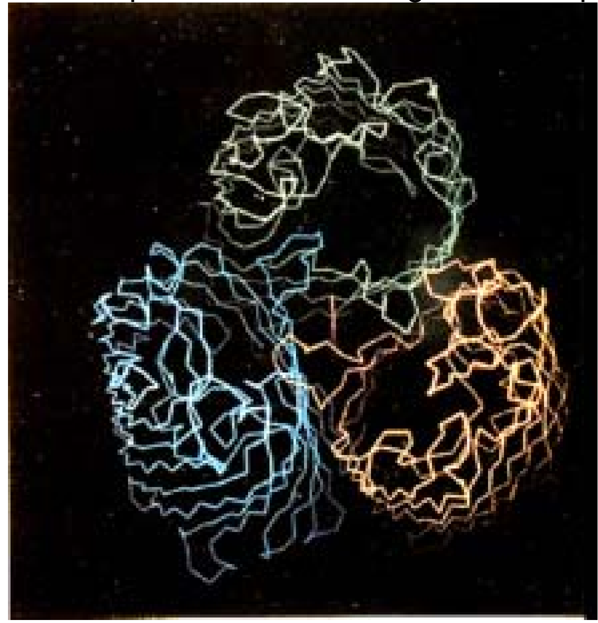
Le lipopolysaccharide est une macro-molécule complexe formée de 3 parties :un lipide A formé d'acides gras à longues chaînes (acide laurique, myristique, palmitique..),d'un core oligosachaidique avec N-acétyl-glucosamine, glucose, galactose, heptose et KDO(2-céto-3-desoxyoctonate), molécule qui assure l'ancrage au lipide A, et d' une chaîne polyosidique latérale conférant la spécificitéO constituée d'unités osidiques répétitives. Le LPS est antigénique (antigène O) et toxique, responsable du choc endotoxinique.





Les porines

Ce sont des protéines trimèriques incluses dans l'enveloppe externe des bactéries à Gram négatif (OmpC, OmpD, OmpF, LamB…). Elles permettent le passage des petites molécules hydrophiles (<6000 Da) et donc la perméabilité aux nutriments , aux antibiotiques et à certains agents chimiques



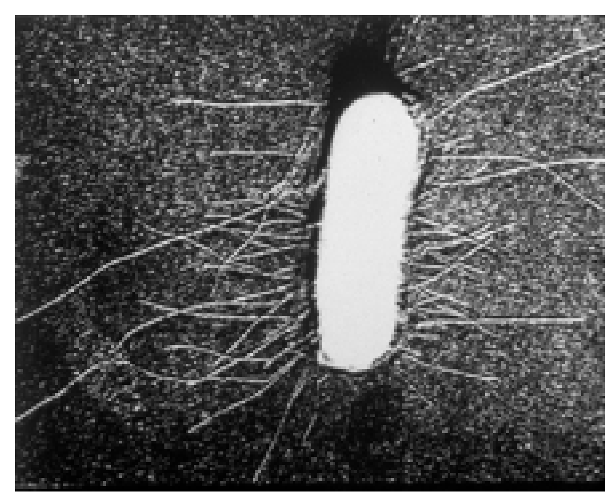
Porines trimériques cristallisées

Les appendices des bactéries

Les pili

Les pili ou *fimbriae* sont des spicules ou appendices formées d'une seule protéine polymérisée (piline). Selon leur diamètre (3-8 nm) et leur constitution on distingue différents types de pili (type I à IV). Les pili de type I sont inhibés par le mannose sont des adhésines. Ce sont des adhésines qui permettent aux bactéries d'adhérer et de

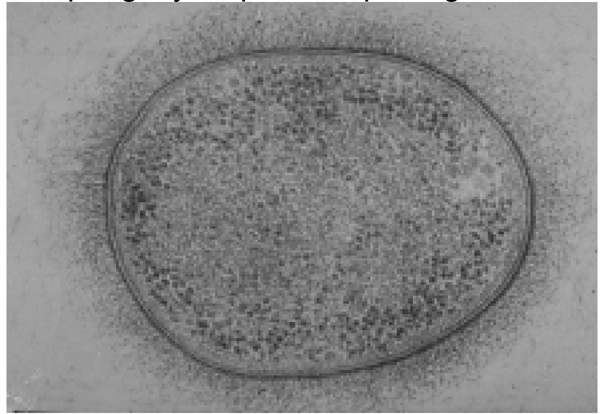
s'agréger, et qui sont des récepteurs de phages.


Pili de *E coli*

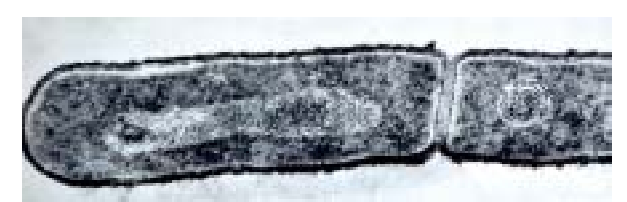
Flagelles
Ce sont des filaments de plusieurs µm constitués d'une seule protéine, la flagelline, permettant le mouvement des bactéries (1 à 30 flagelles par bactérie, à localisation polaire ou péritriche).

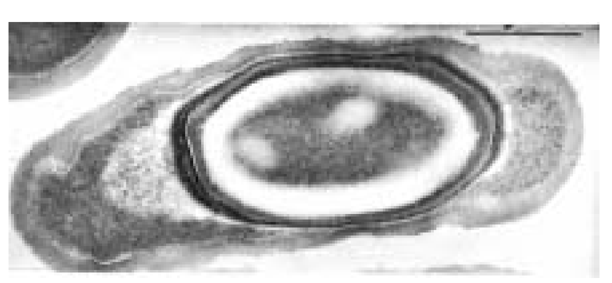

Flagelle polaire

La capsule La capsule est habituellement constituée de polyosides, plus rarement polypeptiques, exposés en surface et protégeant les bactéries de la dessiccation et des phagocytes pour les pathogènes.


Capsule de Streptococcus pneumoniae

Les spores
Les spores n'existent que chez certaines bactéries à Gram positif *Bacillus*, *Clostridium*). La sporulation est induite par des conditions hostiles et confère une extrême résistance aux agents physiques (chaleur, radiations, sécheresse…) et chimiques (acides, solvants…) . Le processus dure 7-10 h. La bactérie avec son génome préservé s'entoure de multiples enveloppes : peptidoglycane, cortex contenant du dipicolate de calcium (important pour la thermorésistance), tuniques internes et externes (protéiques). Cette sporulation explique la nécessité pour stériliser d'utiliser la chaleur humide : 120° C, 20 minutes.


Forme germinative de Bacillus

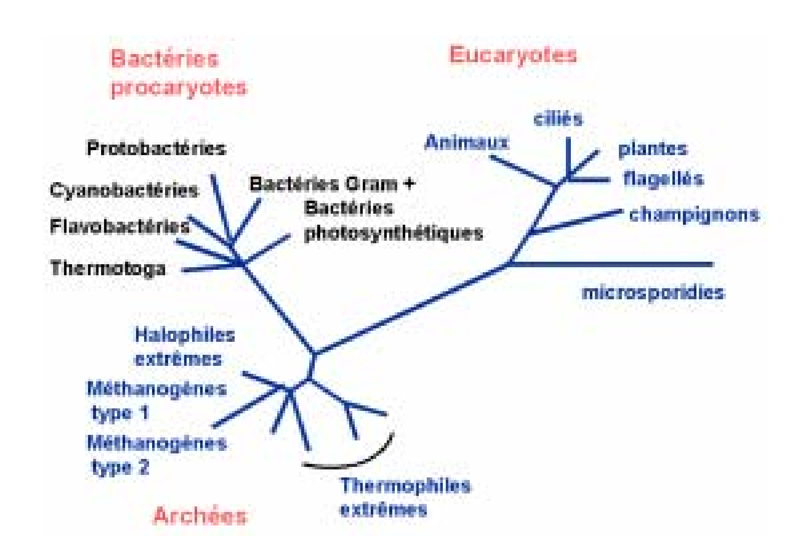

Spore de *Bacillus*

Classification des bactéries

Les bactéries sont classées à partir des données du génome (GC%, séquençage partiel ou total) en grandes familles, en genres et espèces.
Une espèce bactérienne est définit par un taux d'hybridation DNA-DNA de plus de 70% pour les souches d'une population bactérienne donnée. Un genre peut comporter plusieurs espèces génétiquement proches. Exemples : la famille des *Vibrionacae*, le genre *Vibrio*, l'espèce *Vibrio cholerae ;* la famille des *Enterobacteriacae,* le genre *Klebsiella* , les espèces *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozenae, Klebsiella oxytoca, et Klebsiella rhinoscleromatis.* On utilise en pratique pour désigner les bactéries uniquement les noms de genre et d'espèce. Les noms de bactéries s'écrivent en italiques. En l'absence d'identification

précise d'une espèce (ce qui peut arriver sans affecter les décisions thérapeutiques), on utilise la nomenclature *sp* (espèce non précisée): exemple *Klebsiella sp*.
Chaque espèce est constituée d'une population d'individus appelés souches ou isolats bactériens. Ces souches présentent des variations phénotypiques (sensibilité aux antibiotiques, tests biochimiques…) et sont définies par un profil génétique de restriction qui leur est propre. Certaines espèces bactériennes sont oligoclonales, c'est-à-dire qu'elles ne comprennent que très peu de souches, d'autres sont très hétérogènes comprenant beaucoup de souches (hétéroclonales).L'isolement d'une même souche chez plusieurs patients définit une épidémie.
La classification des bactéries médicale est basée sur une approche d'abord empirique (morphologie, Gram, aspect des colonies, aérobiose ou anaérobiose, caractères métaboliques, antigéniques…)., puis par une approche moléculaire (séquençage de gènes type rRNA 16-23s, rpoB, *sod*…).

Cette approche permet de replacer chaque espèce bactérienne au sein de l'arbre phylogénétique du monde vivant.



Classification très simplifiée des bactéries d'intérêt médical.

Bactéries aérobies	Gram +	Coques	Staphylococcus, Streptococcus S pneumoniae,
		bacilles	Corynebacterium, Listeria, Bacillus
		paroi riches de lipides	Mycobacterium tuberculosis, M leprae, M bovis, Nocardia
	Gram -	Coques	Neisseria, Moraxella
		bacilles	E. coli, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Yersinia, Pseudomonas, Vibrio, Campylobacter, Haemophilus, Brucella, Helicobacter
		bactéries intracellulaires	Rickettsia , Chlamydia trachomatis, C psitacci, Coxiella, Ehrlichia
		Bacilles spiralées	Treponema, Borrelia, Leptospira
		Bactéries sans paroi	Mycoplasma
Bactéries anaérobies	Flore de Veillon	Coques et bacilles	
	Gram –	Bacilles	Bacteroides fragilis , Fusobacterium
	Gram +	Bacilles	Clostridium tetani, C botulinum, C difficile, C perfringens

Le conflit hôte-bactéries

Le nouveau-né est stérile à la naissance et, dès les premières heures de la vie, les micro-organismes provenant de son environnement immédiat le contaminent. Très vite s'installe une flore commensale sur la peau et les muqueuses qui variera en fonction de l'âge, de l'alimentation, du climat, des thérapeutiques suivies, pour ne citer que quelques facteurs. Tout au long de la vie, chaque individu est donc exposé à une myriade de micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons). Pour éviter d'être envahi, chaque individu possède un système complexe de défense qui a été mis en place au cours de l'évolution lors de la sélection des espèces.

Définitions

Bactéries commensales et saprophytes. Une bactérie est commensale lorsqu'elle vit au contact du revêtement cutanéo-muqueux d'un hôte auquel elle est inféodée sans entraîner de désordres. Une bactérie est saprophyte lorsqu'elle vit et se nourrit dans l'environnement (sol, eaux, surfaces...). Certaines bactéries sont saprophytes et éventuellement commensales.

Virulence et pathogénicité. La virulence est la capacité d'une bactérie de déclencher une maladie infectieuse chez un hôte sain. Elle est définie par la dose infectante : une bactérie est très virulente lorsque la dose infectante est très faible. La pathogénicité est l'ensemble des mécanismes qui contribuent au déclenchement d'une infection.

Bactéries virulentes et bactéries opportunistes. Il existe deux types de bactéries pathogènes : les bactéries virulentes et les bactéries opportunistes. Les bactéries virulentes sont capables de déclencher une infection chez des hôtes sains en s'implanter sur le revêtement cutanéo-muqueux et éventuellement envahir les tissus ou sécréter des toxines. Il existe 2 types de bactéries virulentes : (1) certaines bactéries virulentes sont très spécifiques de leur hôte humain ou animal à la suite d'une longue période d'adaptation au cours de l'Evolution (*Salmonella, Shigella, E. coli, Streptococcus pyogenes, Corynebacterium diphteriae, Vibrio cholerae*, *M tuberculosis*…). Par exemple, ceci est le cas des bactéries responsables de la typhoïde, du choléra, de la tuberculose, des méningites purulentes, de la diphtérie, de la peste… Les doses infectantes qui déclenchent la maladie est habituellement faibles pour ces espèces bactériennes dont la virulence varie non seulement selon les espèces même très proches (par exemple, *Shigella dysenteriae* et *Shigella flexneri* responsables de dysenterie : S *dysenteriae* est beaucoup plus virulente donnant une maladie plus sévère pour des doses infectantes très faibles), mais aussi en fonction des souches rencontrées (par exemple, certaines souches de *V cholerae* O1 ou O139 sont très virulentes et épidémiques, d'autres dites non-O1 provenant de l'environnement sont très peu virulentes et rarement à l'origine de diarrhée). (2) Plus rarement, d'autres bactéries virulentes proviennent de l'environnement et donnent accidentellement des infections, sans une longue phase d'adaptation à l'homme et aux animaux. Par exemple, il s'agit de bactéries du sol (contaminant les plaies), les aliments, l'eau ou l'air (*Clostridium tetani, Clostridium perfringens, Clostridium botulimum, Listeria monocytogenes, Legionelle pneumophila, Bacillus anthracis*…). Les bactéries opportunistes déclenchent des infections chez l'hôte fragilisé et immunodéprimé. Ces bactéries ne sont pas pathogènes pour les sujets sains. Il s'agit soit de bactéries saprophytes vivant dans l'environnement (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, certaines entérobactéries :*Klebsiella,Enterobacter,Serratia*…) et de bactéries commensales devenant pathogènes chez les sujets aux défenses immunitaires altérées (entérocoques, *Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis*…).

La rencontre hôte bactéries

Transit : de très nombreuses bactéries sont incapables de s'implanter sur la peau ou les

muqueuses pour des raisons d'exigences nutritionnelles ou physiologiques (température de croissance...). Ainsi en est-il probablement de nombreuses bactéries du sol ou de l'eau ingérées avec la nourriture et la boisson. L'hôte les'' ignore'' du point de vue immunitaire.

Commensalisme : certaines bactéries de l'environnement ou provenant d'autres hôtes peuvent s'inféoder sur le revêtement cutanéo-muqueux : c'est le commensalisme. Cette colonisation est transitoire, prolongée ou parfois indéfinie. Ces bactéries n'ont aucune tendance spontanée à envahir les tissus et donc à léser l'intégrité de l'hôte. Cependant leur nombre souvent considérable au contact de certaines muqueuses (digestives...) stimule en permanence le système immunitaire sans conséquence pathologique (formation d'anticorps''naturels''). Cette flore peuvent être la source de nutriments et de vitamines (*E coli* produisant la vitamine K...) et constitue une barrière écologique contre l'implantation de germes virulents. Certaines bactéries commensales sont souvent incapables de survivre en dehors de l'hôte. Ainsi, un équilibre s'installe entre les individus sains et les différentes flores commensales de la peau, des muqueuses buccales, nasales, digestives, uréthrales, vaginales et de la plaque dentaire. Cette flore varie en fonction de l'âge, de l'alimentation, de l'état de la dentition, de l'état de santé (diabète…), des intoxications ou médications (toxicomanie, antibiothérapie...). Enfin, cette flore est source de certains nutriments et vitamines nécessaires à l'hôte (symbiose) et constitue une barrière microbienne contre les microorganismes exogènes et dans certains cas sont

Maladie infectieuse : une maladie infectieuse est le résultat d'un conflit hôte bactéries aboutissant à des lésions chez l'hôte infecté. L'hôte réagit à de telles agressions en mettant en jeu une cascade de défenses non spécifiques et spécifiques, qui tendent à éliminer les bactéries responsables et à neutraliser les produits toxiques libérés ou sécrétés par les germes. Ces mécanismes, dans les cas favorables, entraînent la guérison clinique avec le plus souvent une destruction complète des bactéries virulentes dans les tissus de l'hôte infecté. L'expression clinique de la maladie est le résultat complexe des multiples interactions observées au cours de l'infection entre bactéries et défenses de l'hôte.

Physiopathologie des infections bactériennes

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'hôte de diverses façons : (1) ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (voie digestive); (2) inhalation d'aérosols ou de particules associés à des bactéries (voie respiratoire); (3) inoculation cutanée par contact direct ou indirect (voie cutanée); (4) inoculation muqueuse directe par la salive ou les sécrétions sexuelles; (5) inoculation transcutanée par les insectes (*Yersinia pestis, Rickettsia, Borrelia*...), par traumatismes ou manipulations iatrogènes.
La 1ère phase du processus infectieux est l'implantation (ou colonisation) par les bactéries du revêtement cutanéo-muqueux. Suit éventuellement d'une dissémination des bactéries par la circulation sanguine et de métastases infectieuses à de nombreux organes. Ces grandes étapes sont retrouvées pour tous les micro-organismes (virus bactéries, parasites) et comportent donc une porte d'entrée, une dissémination sanguine éventuelle, des métastases infectieuses. Le diagnostic bactériologique s'attachera donc à rechercher les micro-organismes à partir de ces trois phases du processus infectieux.

L'implantation des bactéries

Les bactéries virulentes s'implantent sur la peau et les muqueuses en franchissant les diverses barrières. Les mécanismes qui permettent de franchir ces barrières, sont peu connus : la mobilité des bactéries, la sécrétion de certaines enzymes (mucinases), vitesse de croissance, compétitivité pour la quête de nutriments ou des ions ferriques (sidérophores), production de bactériocines…Au contact des cellules épithéliales de la peau ou des muqueuses, les bactéries

adhérent et se multiplient au contact des cellules, formant des microcolonies. Des ligands bactériens ou adhésines reconnaissent spécifiquement des récepteurs cellulaires et sont des structures de nature variée :
(1) des pili (*fimbriae*), spicules protéiques ou glycoprotéines associés à la membrane externe des bactéries à Gram négatif (pili CFA, K88, K99 de *E. coli* entéropathogènes, hémagglutinines de *V cholerae* ou de *Bordetella pertussis*).
(2) des protéines ancrées dans la membrane externe (protéine II du gonocoque)
(3) des acides lipotéchoïques (*Strepto-coccus pyogenes*, *Streptococcus mutans*)
(4) des polyosides capsulaires (antigènes K de *E. coli*, capsule de *Streptococcus mutans*).
Les récepteurs cellulaires des adhésines sont des glycoprotéines ou glycolipides exposés à la surface de la membrane cytoplasmique, dont la fonction normale est dévoyée par les adhésines. Ces récepteurs sont parfois des molécules libres (fibronectine, albumine...), qui se fixent ensuite sur un support solide (dents) ou sur les cellules épithéliales. Par exemple, la fibronectine, une glycoprotéine du sérum, de la salive et du tissu conjonctif est le récepteur de l'attachement de *Streptococcus pyogenes* et *S mutans* et s'adsorbe à la surface des cellules de l'oropharynx et des dents.
Ces interactions bactéries-cellules expliquent :
(1) la spécificité d'espèce du pouvoir pathogène de certaines bactéries : par exemple, le gonocoque, le méningocoque, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, certaines *E. coli* de diarrhée sont des bactéries strictement humaines, et d'autres bactéries ne sont pathogènes que pour certaines espèces animales (*E. coli* K88 pour le porc...) et pas pour l'homme.
(2) la sensibilité individuelle des individus : la densité des récepteurs de certaines adhésines varie selon l'âge (nouveau-né) et selon les individus. Ainsi, certaines personnes présentant des infections récidivantes pourraient exprimer une forte densité de certains récepteurs à la surface de certaines cellules épithéliales (infections urinaires récidivantes à *E. coli,* portage chronique de *S. aureus*, streptocoque B, *N. gonorrhoeae*...). Chez l'animal, la sensibilité par exemple des porcs à l'infection par *E. coli* K88 (diarrhées mortelles des veaux nouveau-nés) est liée à l'expression d'un récepteur codé par un gène autosomique dominant. Ce type d'observation permet de comprendre un des mécanismes expliquant la grande variabilité individuelle de la sensibilité aux infections.

La croissance in vivo des bactéries
Après l'implantation des bactéries sur le revêtement cutanéo-muqueux, la suite du processus infectieux est très variable suivant les facteurs de virulence des espèces pathogènes. Il existe des bactéries à multiplication extracellulaires et des bactéries intracellulaires. Ces bactéries peuvent rester à la porte d'entrée ou envahir les tissus.

Bactéries toxinogènes
Parmi les bactéries productrices de toxines (toxinogènes), certaines n'envahissent pas les tissus et restent confinées au revêtement cutanéo-muqueux. Les signes cliniques de la maladie sont alors liés à la production de toxines qui agissent localement sur l'épithélium (*V cholerae*, *E. coli* entéropathogènes...) ou à distance par diffusion sanguine et fixation sur des tissus ou organes cibles (*Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, exfoliatine de *Staphylo-coccus aureus*...). D'autres bactéries toxinogènes envahissent les tissus à la porte d'entrée, en traversant les cellules épithéliales, puis atteignent la sous-muqueuse et peuvent éventuellement donner des septicémies (*S. aureus, Streptococcus sp*…).
Cette dissémination est favorisée par la production d'enzymes, d'exotoxines cytolytiques et de LPS agissant dans le micro-environnement tissulaire des bactéries. Ces substances concourent aux destructions tissulaires et à la lyse cellulaire (macrophages…) et à la protéolyse des protéines inflammatoires (complément…). Les bactéries extra-cellulaires peuvent aussi

être protégées de la phagocytose par une capsule. protégeant les bactéries.

Bactéries à croissance intracellulaire
Certaines bactéries se multiplient dans les cellules épithéliales (parfois dans des cellules endothéliales ou parenchymateuses…), trouvant ainsi un gîte à l'abri des défenses immunitaires (*Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotubercu-losis*, *Y enterocolitica, Shigella sp* , *E coli* entéro-invasives). Ces bactéries peuvent même parfois croître dans les macrophages et les cellules dendritiques et être véhiculées à distance par voie lymphatique et sanguine.

Résistance de l'hôte aux infections

La fréquence d'exposition à des bactéries virulentes et opportunistes contrastent avec la rareté des infections au cours de la vie, sauf en cas de maladies affaiblissant les défenses immunitaires. Il existe plusieurs lignes de défense qui vont s'opposer à l'implantation de nouveaux micro-organismes chez un hôte donné. Ce sont les barrières non spécifiques, l'immunité innée, et l'immunité acquise.

Barrières non spécifiques aux bactéries pathogènes
Il existe beaucoup d'obstacles à l'implantation des bactéries pathogènes sur le revêtement cutanéo-muqueux et à leur croissance tissulaire. Ces barrières non spécifiques jouent rôle important prévenant de nombreuses infections par des bactéries virulentes .

(1) **Les flores commensales** font tout d'abord faire obstacle à l'implantation d'une nouvelle bactérie en créant des écosystèmes hostiles à l'implantation de nouvelles bactéries (compétition pour les nutriments, les sites d'attachement, la captation du fer, le potentiel d'oxydo-réduction, le pH, la production des substances antimicrobiennes type bactériocines et acides organiques...). Lorsque cette flore est éliminée par exemple par une antibiothérapie, on voit apparaître de nombreuses bactéries souvent multirésistantes provenant de l'environnement et de l'alimentation qui vont s'implanter au contact des muqueuses digestives par exemple. Cette flore varie considérablement d'un sujet à l'autre en fonction de l'âge, de l'alimentation, de l'environnement (climat...), de facteurs métaboliques (diabète) ou physiologiques (hormones). On exemple les variations de la flore vaginale ou cutané menstruations, de la puberté, ou de la grossesse... De même les dénutris ou à l'alimentation déséquilibrée ont une flore microbienne profondément altérée.
(2) **Les substances microbicides** produites par le revêtement cutanéo-muqueux. Ainsi, l'acidité gastrique est une barrière majeure s'opposant aux contaminations provenant de l'alimentation et de l'eau. La peau est une remarquable barrière par sa flore et les substances inhibitrices sécrétées par les glandes sudoripares et sébacées : la sueur est bactéricide par sa salinité et les acides gras estérifiés. Très peu de bactéries sont capables de franchir la peau saine (leptospires, brucelles), mais les traumatismes, excoriations, brûlures, piqûres d'insectes permettent le franchissement direct de cette barrière anatomique. Les muqueuses produisent une épaisse couche de mucus (atteignant l'épaisseur de 400 μm sur certains segments de la muqueuse digestive), des sels biliaires, des enzymes protéolytiques digestifs, des molécules-leurres (fibronectine…) saturant les adhésines bactériennes, du surfactant …
(3) **Les facteurs mécaniques** jouent aussi un rôle important : les cils des cellules épithéliales respiratoires éliminent les particules déposées sur cet épithélium ; le péristaltisme intestinal contribue à la vidange des bactéries indésirables ; la vidange vésicale par les mictions ; la desquamation des épithélium intestinaux ou cutanés …
(4) **La fièvre** est un mécanisme de défense important contre la multiplication des bactéries dans les tissus infectés. Elle est due à la libération de substances pyrogènes par les granulocytes. Ce sont de petites protéines (<15kDa) qui agissent indirectement sur le centre hypothalamique

de la thermorégulation. La fièvre peut aussi être déclenchée par la sécrétion de prostaglandines (en particulier PGE1), métabolites de l'acide arachidonique qui agissent directement sur l'hypothalamus. Ces prostaglandines sont produites par les lésions cellulaires étendues (brûlures, blessures, réactions immunopathologiques, action cytolytique des toxines bactériennes). La fièvre inhibe la croissance tissulaire des bactéries. De plus, la fièvre a de multiples effets sur l'hôte : diminution de la disponibilité en certains oligo-éléments (fer, zinc), augmentation de la mobilité des granulocytes et de leur capacité bactéricide, accélération des processus de prolifération lymphocytaire, augmentation de la production d'interféron.

(5) **La carence en fer** dans les sécrétions et les tissus est un obstacle majeur à la prolifération bactérienne. Le fer est un composant essentiel des systèmes catalytiques de nombreuses protéines, incluant la chaîne des cytochromes indispensable à la respiration des bactéries. Dans l'organisme, en présence d'oxygène, les ions Fe^{2+} génèrent des radicaux hydroxyles très toxiques pour les cellules, et le fer Fe^{3+} précipite sous forme Fe (OH)3 insoluble. C'est pourquoi le fer ionique est en très faible concentration dans les tissus (10^{-18} M), alors que des taux de 10^{-5} M sont requis pour la croissance bactérienne. Ainsi, les ions Fe^{3+} ne sont pas libres mais véhiculés dans le milieu extracellulaire par des protéines très affines, la transferrine dans le sérum et la lactoferrine dans les sécrétions. Dans le cytoplasme des cellules, le fer est stocké par une protéine polymérisée, la ferritine. Pour se procurer les ions Fe^{3+} indispensables à leur croissance, les bactéries virulentes produisent des sidérophores, petites molécules non protéiques (500-1000 Da), très affines pour les ions Fe^{3+} et entrant en compétition avec la transferrine et la lactoferrine. Ces molécules sécrétées par les bactéries rapportent les ions Fe^{3+} aux bactéries. Le rôle de ces sidérophores dans la virulence bactérienne a été clairement établi avec certaines espèces bactériennes à croissance extracellulaire (*E. coli, Klebsiella pneumoniae*) ou intra-cellulaire (certaines salmonelles).

La barrière du système immunitaire

Tout microorganisme qui s'implante et envahit un hôte rencontre d'abord les cellules du système immunitaire associé au revêtement cutanéo-muqueux et aux tissus. Il s'agit: (1) de macrophages (macrophages alvéolaires, macrophages résidents de la moelle, de la rate, cellules de Küpffer, cellules microgliales) et des cellules présentatrices des antigènes (cellules dendritiques, cellules M, cellules de Langerhans de la peau) ; (2) de lymphocytes T et B en amas et disséminés tout le long des muqueuses. Cette rencontre avec le système immunitaire induit une cascade de réponses immunitaires pour éliminer l'agent infectieux. La rapidité et l'intensité de ces réponses sont conditionnées par les propriétés des bactéries (dose infectante, nature des facteurs de virulence, rapidité de croissance, persistance...) et par des propriétés de l'hôte : facteurs génétiques (espèce, race, sexe...), facteurs physiologiques et environnementaux (âge, alimentation, maladies intercurrentes, climat...). Ces facteurs détermine le degré de résistance aux infections d'un individu donné.

Le système immunitaire est constitué de formations lymphoïdes réparties dans les tissus et le long du revêtement cutanéo-muqueux. Ces tissus lymphoïdes associés au tube digestif et à l'arbre respiratoire sont appelés GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) (amygdales, plaques de Peyer, végétations adénoïdes) et BALT (*Bronchus-Associated Lymphoid-Tissue*) (nodules lympho-épithéliaux). Les amas lymphoïdes associés à des cellules M jouent un rôle dans la présentation des micro-organismes. Les tissus sont par ailleurs infiltrés par des lymphocytes disséminés dans les muqueuses :(1) lymphocytes intra-épithéliaux (1/6 entérocytes, 2-3 x 10^5/ cm^2) dont 80% de lymphocytes T CD8 ; (2) lymphocytes T et B chorioniques:; (3)

plasmocytes à IgA (80%) et IgM (17%). Le BALT est beaucoup moins stimulé que le GALT car les voies respiratoires inférieures sont stériles. Au contact du GALT et du BALT, les micro-organismes ingérés ou inhalés sont en contact et souvent détruits par les macrophages des amas lymphoïdes ou par les macrophages alvéolaires. Comme les cellules M des plaques de Peyer, les cellules de Langerhans de l'épiderme insérées entre les mélanocytes et les kératinocytes, forment une sorte de filet tangentiel (500-1000 cellules par mm^2) et jouent un rôle important dans la captation, le *processing* des antigènes en contact avec la peau et la présentation des antigènes aux lymphocytes.

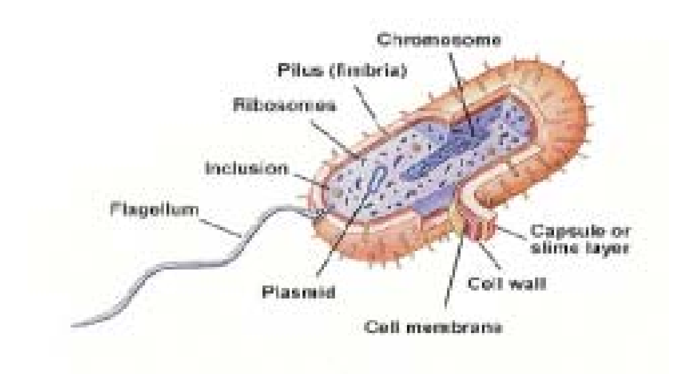
Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense du système immunitaire contre les agressions microbiennes. Son rôle est capital dans la survie aux infections. Son but est d'éliminer très rapidement l'agent pathogène lorsqu'il se trouve dans un tissu habituellement stérile. L'immunité innée est apparue très tôt dans l'Evolution chez les plantes et les invertébrés. Cette immunité innée est transmise à la descendance par les gamètes et dispose de récepteurs ayant un répertoire de une faible diversité (tout au plus quelques centaines de récepteurs de faible affinité (peu spécifiques) pour des structures très conservées des microorganismes.

La réponse de l'immunité innée est immédiate dans les minutes qui suivent l'agression microbienne, basées sur la reconnaissance des antigènes conservés par des récepteurs. Son but est de permettre une réaction inflammatoire rapide avec recrutement de phagocytes (par margination et diapédèse des leucocytes) et extravasation des protéines inflammatoires microbicides au site infecté pour éliminer les agents infectieux.

Propriétés des immunités innée et acquise

Immunité innée	immunité adaptative
Phagocytose Protéines inflammatoires (C) Peptides antimicrobiens	Production d'anticorps, de T cytotoxiques et de cytokines
Réponse immédiate "non spécifique"	Réponse retardée, mémoire immunitaire
origine ancienne	origine récente
Transmission verticale par les cellules germinales	Pas de transmission verticale
Faible diversité des récepteurs façonnés par l'Évolution	Diversité très forte par sélection clonale des lymphocytes B et T
> 100 récepteurs reconnaissant des structures très conservées	> 10^8 récepteurs Ig et T reconnaissant une infinité de structures antigéniques Immunoglobulines 10^{14} Récepteurs T 10^{18}



Les effecteurs de l'immunité innée sont :

(1) la phagocytose : il existe plusieurs types de cellules phagocytaires, les macrophages-monocytes et les polynucléaires. Les bactéries opsonisées par le complément (et les anticorps en réponse secondaire) sont internalisées avec formation d'une vacuole qui fusionne avec le lysosome et induit la mort bactérienne.

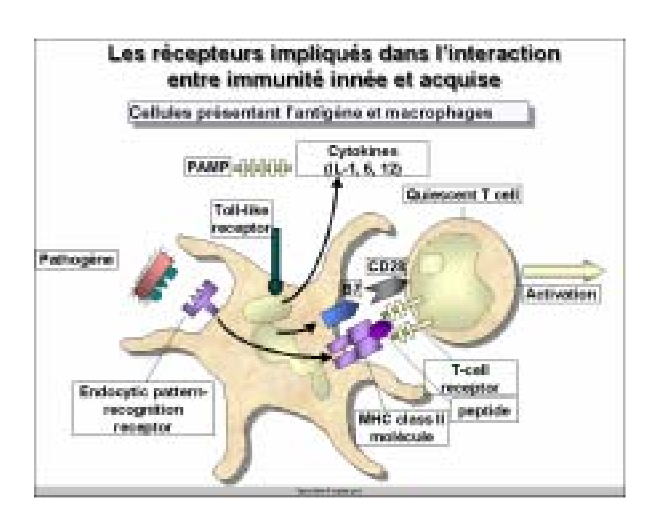
(2) les protéines inflammatoires : ces protéines ont un rôle stimulant le recrutement cellulaire au site de l'infection et lytique direct sur les microorganismes. Elles sont surtout représentées par le système du complément.

(3) les peptides antimicrobiens : ils sont produits par les cellules épithéliales et les macrophages et ont une action lytique directe sur les microorganismes.

Antigènes et récepteurs de l'immunité innée

Les antigènes reconnus par l'immunité innée sont des structures microbiennes très conservées dans le monde vivant : les

lipopolysaccharides ou LPS, les peptidoglycanes, les acides lipoteichoïques, les lipoprotéines, les lipoara-binomannans , les mannanes et manno-protéines , le zymosan (levures), les *heat-shocked* protéines. Ces antigènes sont appelés *Pathogen-associated molecular patterns* ou PAMPs des agents pathogènes.
Les récepteurs de l'immunité innée (*Pattern-Recognition Receptors* PRR) qui reconnaissent les antigènes bactériens sont de 3 types de récepteurs PRR : (1) les récepteurs sécrétés (complément, lectines) ; (2) récepteurs endocytiques des macrophages, soit récepteurs de surface (*macrophage-mannose receptor, macrophage-scavenger receptor* (CD-14, MARCO), soit récepteurs intra-cellulaires (PKR , NODs) ; (3) récepteurs de signalisation : les Toll-like récepteurs.



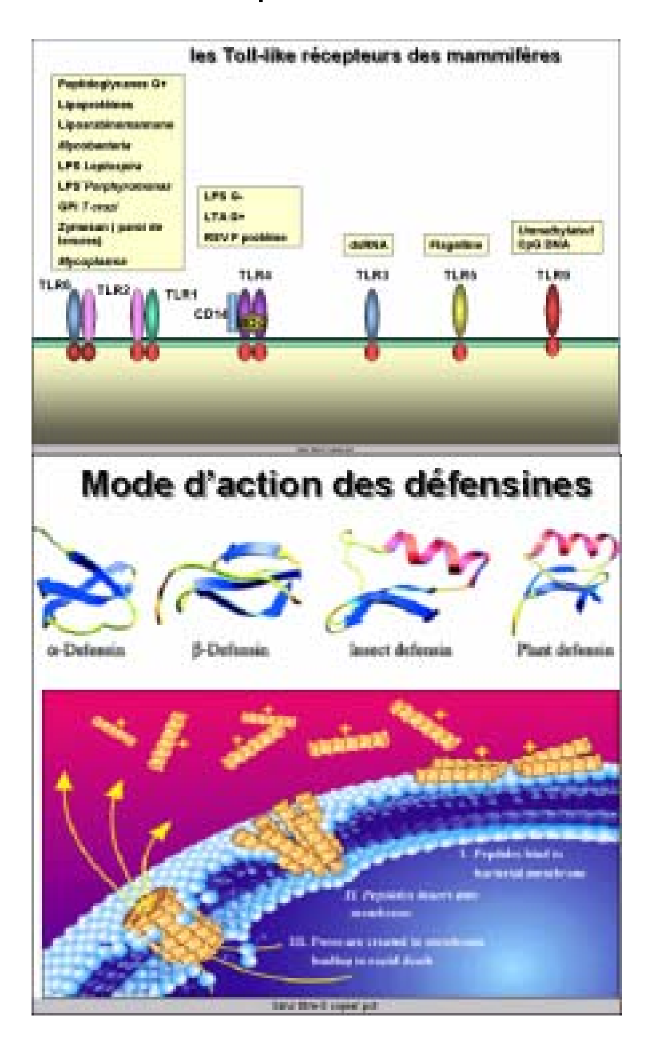
Protéines inflammatoires

Les protéines inflammatoires sont surtout représentées par le système du complément. C'est une cascade enzymatique comportant plus de 30 protéines sériques, soit 15% de la fraction globuline du sérum (3 g / L de plasma). Ses fonctions physiologiques sont :(1) la défense contre les infections par opsonisation, chimiotactisme, activation des leucocytes, lyse des bactéries et des cellules (le complexe lytique du complément est constitué de neuf protéines principales C1-C9) ; (2) la fonction *scavenger* en élimination les cellules apoptotiques et les immuns complexes ; (3) l'interface entre immunité innée et acquise, augmentant les réponses anticorps et la mémoire immunologique.
Le système du complément peut être activé par 3 voies : (1) la voie alterne directement activée par de nombreuses bactéries, parasites, virus, champignons, ou cellules tumorales ;(2) la voie mannose-*binding*-lectine activée par des microorganismes ayant des groupes mannose terminaux ;(3) la voie classique (anticorps-dépendante) activée par des immuns complexes, des cellules apoptotiques, certains virus et certaines bactéries Gram négatif, enfin la C-réactive protéines associée à un ligand. Le rôle majeur du complément dans les défenses contre les infections bactériennes est illustré par la sensibilité aux infections bactériennes (*H influenzae*, *S pneumoniae, Neisseria meningitidis*) des patients avec certains déficits en composants du complément.

Les Toll-like récepteurs

Les Toll-like récepteurs sont des PRR reconnaissant de nombreuses structures bactériennes. Il en existe au moins 9 chez l'homme, dont le TLR-4 qui reconnaît le LPS des bactéries Gram négatif, les LTA des bactéries Gram positif, et la protéine F du virus RSV . Ces récepteurs dits TLRs déclenchent la cascade d' activation du facteur NF-kB, activateur transcriptionnel de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la défense contre les infections (cytokines, molécules d'adhésion, protéines du complément et défensines). Les principales cytokines sont le TNF-α, TNF-β, INF-α, IL-1α , IL-1β, IL-2, IL-3, IL-8, IL-12. L'interleukine IL-1 produite par les macrophages et les cellules endothéliales joue un rôle dans la fièvre, stimule la production de prostaglandine, et favorise la diapédèse leucocytaire. Les interleukines IL-8 et IL-6 produites par les macrophages et les cellules endothéliales sont impliquée notamment dans la margination leucocytaire.

Les Toll-Like recepteurs



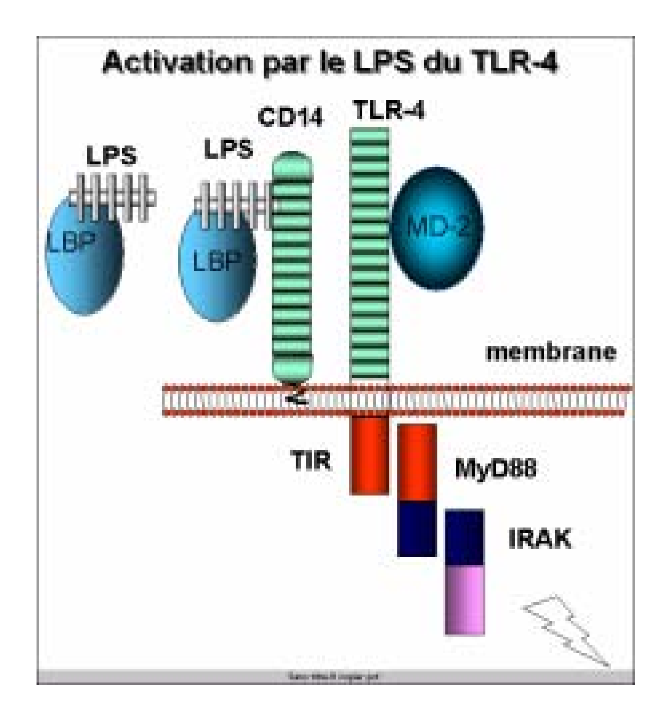
L'ensemble de ces cytokines ont un effet bénéfique en concourrant à l'élimination des bactéries. Dans certains cas, cette réponse liée aux cytokines est exagérée, ce qui produit le choc septique. Enfin, l'immunité innée déclenche la production de peptides anti-microbiens, les défensines par les leucocytes et les épithéliums. Ces peptides détruisent directement les microorganismes comme des toxines cytolytiques.

Choc endotoxinique des bactéries Gram négatif

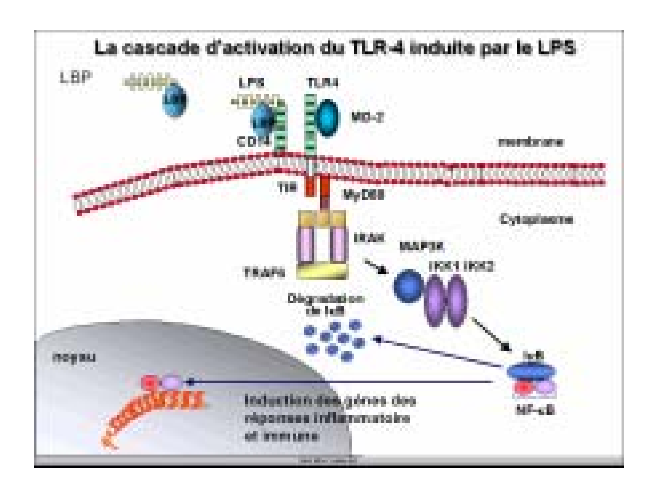
Syndrome clinique. Ce choc endotoxinique responsable d'une importante mortalité en milieu hospitalier, associe fièvre, collapsus brutal et hémorragies diffuses. Le collapsus est dû à la libération massive de cytokines et de substances vasodilatatrices libérées par les polynucléaires, les plaquettes ou le système du complément (anaphylaoxines, histamine,...), et par l'activation de la kallikréine (bradykinine). Cela entraîne une vasodilatation capillaire avec augmentation de la perméabilité vasculaire et fuite liquidienne vers les tissus. La coagulation intravasculaire disséminée est liée à l'activation du système de la coagulation et des plaquettes aboutissant à la formation de nombreux thrombi de fibrine dans les capillaires périphériques avec consommation massive des facteurs de la coagulation (chute du taux de prothrombine et de fibrinogène, ...) et une thrombopénie sévère. L'activation du facteur XII induit celle du plasminogène qui est transformé en plasmine. Ce produit lyse la fibrine avec apparition de produits de dégradation de la fibrine dans le plasma.
Ces interactions complexes entre le LPS bactérien et les divers systèmes cellulaires ou humoraux ont plusieurs conséquences graves : (1) un choc hypovolémique par fuite liquidienne vers le compartiment extra-vasculaire; (2) une ischémie et une nécrose tissulaire, atteignant de nombreux organes et rendant difficile l'accès aux tissus infectés pour les effecteurs de l'immunité: les reins (nécrose corticale), les poumons, le cerveau, les surrénales (syndrome de Waterhouse-Friedricksen des méningites à méningocoques); (3) des hémorragies diffuses : hématomes cutanéo-muqueux (hématurie, hémorragies digestives...) par consommation massive de facteurs de la coagulation. Le passage des globules rouges à travers le réseau fibrineux plus ou moins fragmenté dans les capillaires est à l'origine d'une altération et d'une lyse érythrocytaire (anémie hémolytique microangiopathique). Le pronostic du choc endotoxinique est souvent réservé et dépend de la rapidité de la mise en oeuvre des techniques de réanimation.

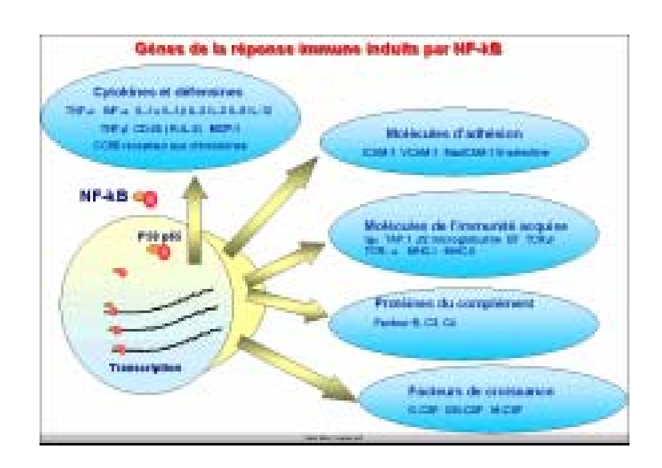
Physiopathologie du choc endotoxinique. Au cours des septicémies où le nombre des bactéries peut être considérable, la lyse bactérienne rapidement entraînée par les défenses de l'hôte ou par un traitement antibiotique peut être à l'origine d'un choc endotoxinique par libération massive de lipopolysaccharides (LPS). Après lyse des bactéries, le LPS libéré se fixe à une

protéine sérique, la LBP (LPS *binding protein*). Ce complexe LBP+LPS est reconnu à la surface des macrophages par le CD14 et le TLR-4.



Ceci entraîne l'activation d'un facteur transcriptionnel cellulaire NF-kB, qui induit la production massive de très nombreux gènes impliqués dans l'inflammation.





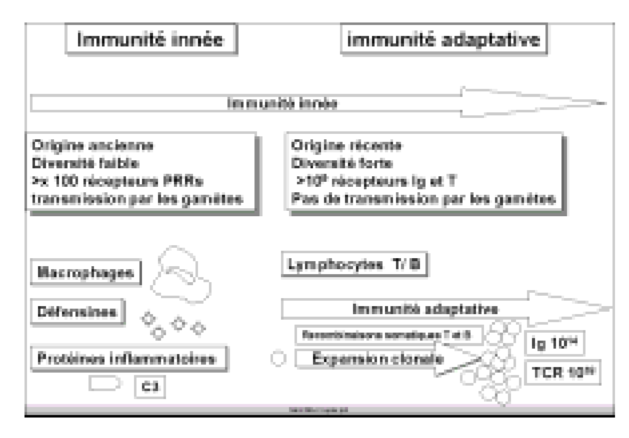
Action du LPS sur les phagocytes. La fixation et l'endocytose du LPS par les phagocytes entraînent la synthèse et la libération par ces cellules de petites molécules protéiques pyrogènes de poids moléculaire 10-20 kDa, surtout à partir des cellules de Küppfer du foie et des granulocytes. La fixation du LPS entraîne la libération du contenu lysosomial des phagocytes vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, sont relargués dans la circulation : (1) des protéases qui dégradent les protéines du complément en anaphylatoxines (C3a-C5a) et des enzymes qui concourent aux lésions tissulaires; (2) des protéines cationiques qui stimulent la libération d'histamine par les mastocytes et stabilisent les thrombi de fibrine; (3) des médiateurs vasoactifs de la réaction inflammatoire (activation de la kallikréine avec formation de bradykinine). Ces médiateurs jouent un rôle important dans la génération du choc septique par vasodilatation du système vasculaire périphérique.

Action du LPS sur la coagulation et le complément. Le LPS induit la libération du contenu granulaire des plaquettes qui s'agrègent dans les capillaires et libèrent le facteur 3. Cela entraîne une thrombose capillaire avec des troubles importants de la perméabilité de ces vaisseaux par relargage d'enzymes, d'amines vasoactives et de prosta-glandines. Le LPS, de plus, active le facteur XII (Hageman) déclenchant la cascade des enzymes de la coagulation. La fibrine ainsi formée obstrue les capillaires sanguins.

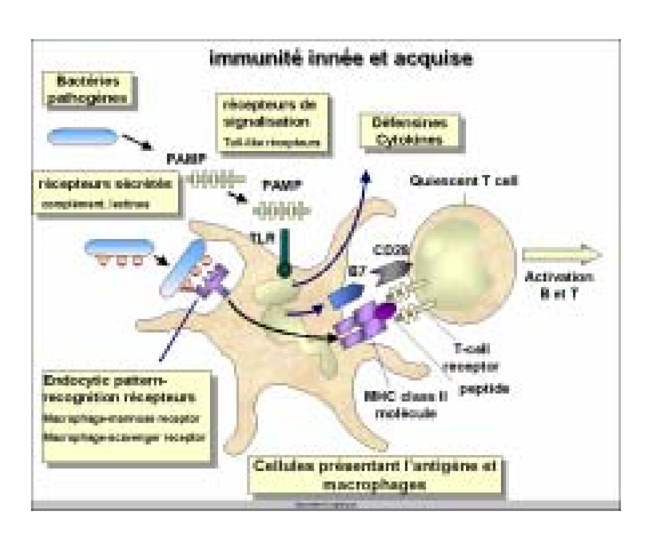
Lors des septicémies à bactéries à Gram négatif, on observe une baisse importante du taux sanguin de complément. Celui-ci peut

être directement activé par le LPS, à la fois par la voie alterne (lipide A) et par la voie classique après fixation des anticorps sur les chaînes polyosidiques. Cela entraîne la libération massive de produits de dégradation du complément qui participent à la réaction inflammatoire. Les complexes LPS-complément ont aussi des effets sur de multiples cellules (plaquettes, mastocytes) avec libération d'histamine et autres médiateurs.

Immunité adaptative ou acquise



L'immunité acquise fait suite à l'immunité innée qui favorise son développement. Cette immunité est retardée et contribue à la mémoire immunitaire.



L'immunité acquise est liée à la production d'anticorps par les plasmocytes et de Th1 et Th2 cytotoxiques, avec induction de cytokines. Cette immunité est d'apparition récente dans l'Evolution avec l'apparition des vertébrés. Elle possède la capacité de générer une très forte diversité par recombinaison somatiques et sélection clonale des lymphocytes B et T reconnaissant une infinité de structures antigéniques avec une haute affinité et spécificité (>10^9 récepteurs Ig et T, pour les Ig 10^{14} , pour les TcR 10^{18}). Cette immunité n'est pas transmise à la descendance. L'immunité acquise peut être considérée comme la trace de l'histoire personnelle des individus, non transmise à la descendance, à la différence de l'immunité innée qui reflète l'histoire des agressions microbiennes d'une lignée. Au contact du revêtement cutanéo-muqueux, les antigènes bactériens sont pris en charge par le BALT ou le GALT et les lymphocytes sensibilisés migrent dans la circulation pour revenir (homing) dans les muqueuses où la synthèse d'IgA est initiée localement. Synthétisées et sécrétées par les plasmocytes de la lamina propria, les IgA sécrétoires, immunoglobulines associées à une pièce sécrétoire qui les protège des enzymes protéolytiques, traversent par pinocytose les cellules épithéliales (bronchiques ciliées ou entérocytes) et sont excrétées par l'apex de ces cellules. Il s'agit surtout d'IgA2 plus résistantes que les IgG aux enzymes intra-luminales. Les IgA neutralisent les toxines et opsonisent les bactéries, prévenant ainsi leur adhésion. Certains patients atteints de déficit en IgA sécrétoires présentent des infections à répétition, mais des phénomènes compensateurs (sécrétion d'IgM et d'IgG) semblent exister chez d'autres qui ne présentent aucune infection.

Les infections par les bactéries à multiplication extracellulaire induisent une immunité de type humorale. A l'opposé, les bactéries à multiplication intracellulaire mettent en oeuvre des macrophages recrutés et activés par les lymphocytes T (immunité cellulaire T).

Immunité humorale contre les bactériries. L'importance du rôle des anticorps dans la résistance aux infections est mise en exergue par la fréquence accrue des infections bactériennes chez les enfants

agammaglobulinémiques (maladie de Bruton). Le mécanisme d'action des anticorps est :

(1) **la neutralisation** des exotoxines et enzymes bactériennes (staphylocoques, streptocoques A, *Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis, Pseudomonas aeruginosa*...) ; la production d'anticorps neutralisants qui inhibent la fixation de ces molécules sur leurs récepteurs cellulaires est la base de la vaccination contre les bactéries toxinogènes (anatoxines diphtérique et tétanique).

(2) **L'opsonisation** par les anticorps qui facilitent la phagocytose des bactéries à multiplication extracellulaire qui résistent à la phagocytose par leur structure de paroi (capsule, pili). Les anticorps opsonisants recouvrent les bactéries et l'attachement aux macrophages se fait par les récepteurs du Fc des immunoglobulines. L'opsonisation par les anticorps est importante notamment lors des infections à pneumocoques (polyoside de capsule), à streptocoque A (protéine M), à staphylocoques (protéine A, acides téchoïques...), à certaines bactéries à Gram négatif (hémophiles, E. coli, Klebsiella...).

(3) **la lyse bactérienne** par des anti-corps IgM et IgG se fixant sur la paroi des bactéries et initiant une lyse en présence de complément par la voie classique d'activation.

Immunité cellulaire T contre les bactéries. Les anticorps ne jouent qu'un rôle mineur ou nul dans les infections dues à des bactéries à multiplication intracellulaire, car ces bactéries sont inaccessibles aux anticorps (mycobac-téries, *Listeria monocytogenes*, *Salm-onella*, *Brucella*, *Rickettsia*, *Legionella*, *Chlamydia*...). Le système immunitaire réagit en induisant une prolifération clonale des lymphocytes T spécifiques des antigènes bactériens exprimés à la surface des macrophages et des cellules infectées. Ces lymphocytes T ont d'une part une activité cytotoxiques lysant les cellules infectées et exposant les bactéries aux macrophages et aux polynucléaires, et d'autre part une activité de recrutement et d'activation des macrophages. Il existe deux classes de lymphocytes T : Th1 et T h2. Les lymphocytes T amplifient donc la réaction inflammatoire en permettant l'infiltration des tissus infectés par des macrophages plus nombreux et plus actifs. Les macrophages forment des granulomes inflammatoires où les bactéries sont confinées et détruites.

Conséquences immunopathologiques de la réponse B et T. La réponse immunitaire spécifique permet la guérison mais peut entraîner certaines conséquences immuno-pathologiques néfastes pour le malade pendant l'infection ou au décours de l'infection. Des lésions immuno-pathologiques peuvent être dues aux anticorps et aux lymphocytes T. On distingue trois réactions immuno-pathologiques liées aux anticorps:

(1) **l' anaphylaxie** due, chez certains sujets, à la production élevée d'IgE qui, en présence d'antigènes bactériens, s'attachent aux mastocytes et libèrent des médiateurs chimiques tels que l'histamine (expliquant certains rashs cutanés, par exemple lors des infections méningocoques ou à tréponèmes).

(2) la cytolyse **entraînant la lyse de certaines** cellules de l'hôte infecté qui présentent à leur surface des structures antigéniques analogues à celles de la bactérie (exemples : lésions cardiaques ou neurologiques des infections à streptocoque A, hémolyse des infections pulmonaires à *Mycoplasma pneumoniae*…).

(3) **les immuns complexes** formés lors d'une infection bactérienne entraîne l'activation du complément et l'exacerbation de la réponse inflammatoire, avec dépôt sur les membranes basales des vaisseaux cutanés, des glomérules rénaux ou des séreuses des articulations entraîne glomérulonéphrites, rashs, ou arthrites (*Streptococcus pyogenes*...), voire coagulation intravasculaire disséminée. L'accumulation d'immuns complexes extravasculaires dans les foyers inflammatoires amplifie et exacerbe la réaction inflammatoire (alvéolite, érysipèle, rashs). Enfin, la persistance chronique des germes dans les granulomes infectieux, malgré le développement d'une immunité cellulaire T, peut avoir des conséquences

graves. L'augmentation de la réaction inflammatoire peut entraîner une nécrose tissulaire lors de la survie des bactéries dans les lésions ou lors de la réinfection (phénomène de Koch, nécrose caséeuse de la tuberculose...). Ailleurs, les granulomes deviennent chroniques et extensifs (lèpre, actinomycose, gomme syphili-tique...).

Résistance des bactéries à la réponse immune

Les bactéries virulentes envahissent les tissus et se propagent dans l'organisme. Elles possèdent des mécanismes leur permettant de surmonter les défenses de l'hôte.

Résistance au complément

De nombreuses bactéries virulentes sont sensibles au complément, expliquant qu'on ne puisse les isoler qu'exceptionnellement à partir du sang des malades. Les signes cliniques de la maladie restent souvent alors localisés à la porte d'entrée (par exemple, *Shigella* ou *V cholerae*). D'autres résistent au complément par la sécrétion d'enzymes protéolytiques (*Pseudomonas aerugnosa*) ou par leur paroi (capsule, lipopolysaccharide, protéines de la membrane externe) empêchant le C3 de se fixer à la bactérie.

Résistance à la phagocytose

La résistance des bactéries à la phagocytose est également une étape cruciale du processus infectieux par les bactéries invasives. Cette résistance peut être due à plusieurs mécanismes : (1) **inhibition du chimiotactisme** : certaines bactéries inhibent la migration des polynucléaires par action directe de toxines sur les polynucléaires neutrophiles (certains *E. coli, Capno-cytophaga*) ou par destruction des phagocytes par des toxines cytolytiques (leucocidines de *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, strepto-lysines O et S, toxine α de *Staphylococcus aureus* et de *Clostridium perfringens*…) ou encore par inhibition de l'activation du complément.

(2) **inhibition de l'attachement aux phagocytes :** de nombreuses bactéries virulentes résistent aux phagocytes par une capsule (*S. pneumoniae, K. pneumoniae*...), de pili ou de structures apparentées (protéine M des streptooques A), ou d'un lipopolysaccharide (*E. coli* O_{111} K_{58}). Ces structures pourraient inhiber la liaison des opsonines du complément avec la bactérie, ou masquer les opsonines fixées qui ne peuvent plus accéder à leur ligand sur les phagocytes (récepteurs du C3).

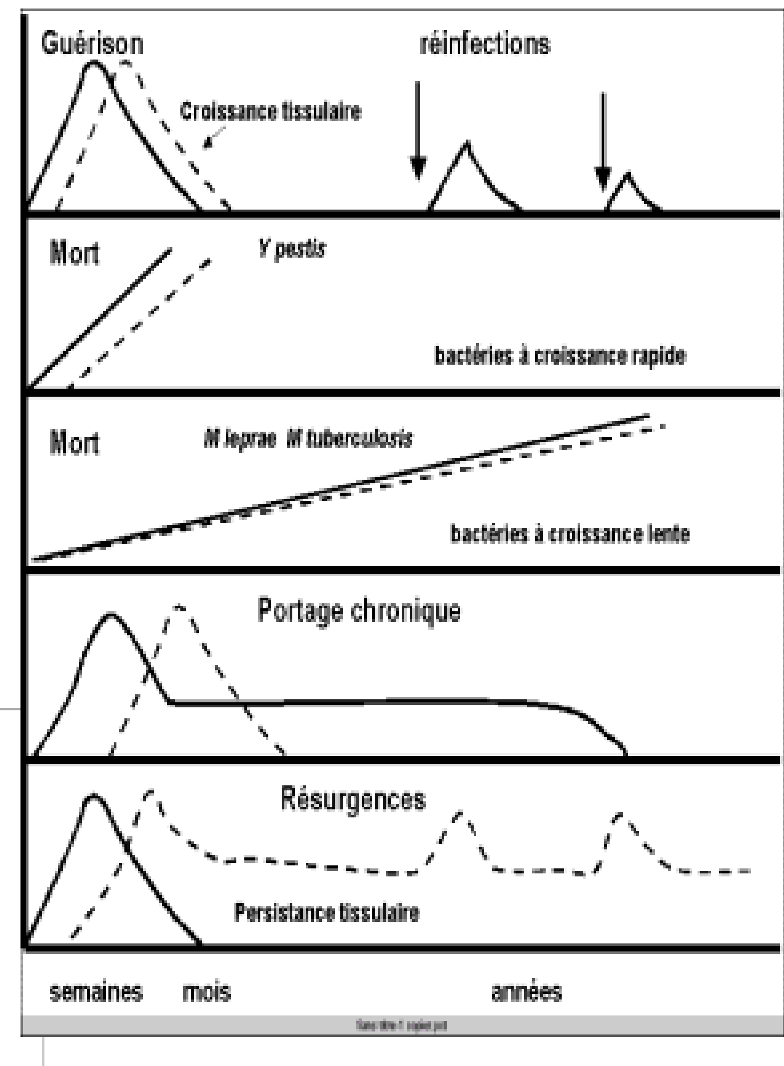
(3) **inhibition de l'ingestion** : certaines bactéries (gonocoques, mycoplasmes) peuvent se fixer sur les phagocytes, mais ne sont pas ingérées.

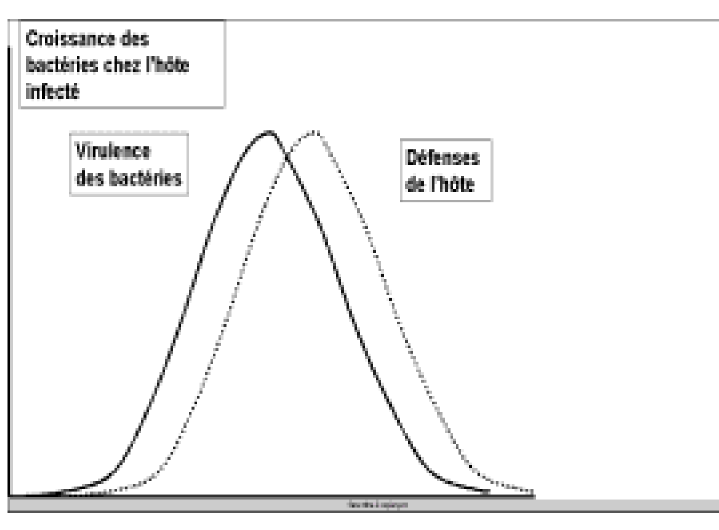
(4) **résistance à la destruction intracellulaire :** certaines bactéries sont ingérées sans difficulté, survivent et se multiplient dans les phagocytes. Plusieurs mécanismes sont connus : survie dans le phagosome par inhibition de la fusion phagolysosomale ; survie dans la phagolysosome avec résistance au burst oxydatif et aux enzymes lysosomales ; survie dans le cytoplasme après échappement du phagosome.

Le devenir des bactéries dans l'organisme infecté

Le devenir des bactéries dans l'hôte au cours d'une maladie infectieuse passe par une phase de croissance correspondant à l'implantation et à la diffusion tissulaire des bactéries. Puis, l'immunité contrôle le plus souvent la prolifération bactérienne dans les tissus et à la porte d'entrée et les bactéries sont éliminées. L'hôte garde une résistance acquise de longue durée contre toute réinfection. Dans les cas défavorables, l'hôte ne peut se débarrasser des bactéries à croissance lente (lèpre, tuberculose…) ou rapide (peste…) et finit par mourir. Il est fréquent que les bactéries après guérison restent implantée à la porte d'entrée pendant quelques mois. Au cours de ce portage chronique qui contribue à la transmission de la maladie, le germe se comporte habituellement comme une bactérie commensale pour l'hôte (*Streptococcus pyogenes* , *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, , *Neisseria meningitidis*, , *Chlamydia*, *Salmonella typhi*...). Enfin, certaines bactéries peuvent

persister dans les tissus de façon asymptomatique, mais des résurgences sont possibles des années après la primo-infection. Les bactéries sont séquestrées autour d'un corps étranger (prothèse, suture, calcul, parasite tel que bilharzie) ou dans un granulome fibreux (*Staphylococcus aureus, M. tuberculosis, Pseudomonas pseudomallei*…), dans un tissu non accessible au système immunitaire (chambre antérieure de l'oeil pour T pallidum et leptospires…), ou encore dans des sites intracellulaires comme des cellules épithéliales ou endothéliales (*Chlamydia*, rickettsies…). Il peut en résulter des résurgences de la maladie des années ou décennies plus tard.





Survie des bactéries extracellulaires : toxines bactériennes et variation antigénique

Les toxines des bactéries pathogènes

Les bactéries produisent des composants toxiques. Il peut s'agir de structures bactériennes comme le lipo-polysaccharide de la paroi des bactéries à Gram négatif, ou endotoxine, qui joue un rôle crucial dans l'apparition du choc dans les états septiques à bactéries à Gram négatif. Beaucoup de bactéries pathogènes sécrètent des exotoxines protéiques qui sont classées selon leur mode d'action (enzymes) et souvent à l'origine de symptomatologies particulières. Certaines exotoxines agissent à l'extérieur de la cellule en se liant avec des récepteurs cellulaires ou en induisant des pores membranaires. D'autres transloquent pour agir sur des cibles cytoplasmiques spécifiques.

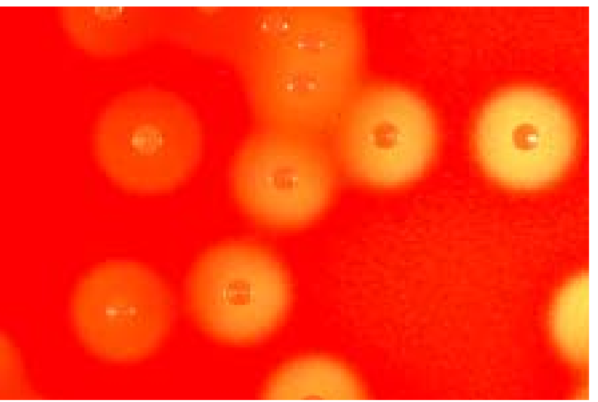
Les toxines des bactéries pathogènes

Maladies	bactéries
diphtérie	*Corynebacterium diphtheriae*
tétanos	*Clostridium tetani*
coqueluche	*Bordetella pertussis*
botulisme	*Clostridium botulinum*
choléra	*Vibrio cholerae*
charbon	*Bacillus anthracis*
Choc septique	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes*
Fasciite nécrosante	*Streptococcus pyogenes*
Gangrène gazeuse	*Clostridium perfringens*

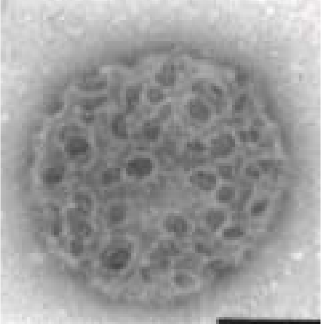
Toxines agissant sur la membrane cellulaire ou formant des pores

Ces toxines sont produites par de nombreuses bactéries. Ce sont des cytotoxines agissant sur la membrane lipidique et entraînant une lyse cellulaire : phospholipases (α toxine de *C. perfringens,* phopholiases C de *P aeruginosa*,) , sphingomyélinases (ß toxines *S. aureus*…), exotoxines SH-dépendante (streptolysine O-SLO, listé-riolysine O-LLO…), peptides lyti-ques (toxines δ *S. aureus*…)

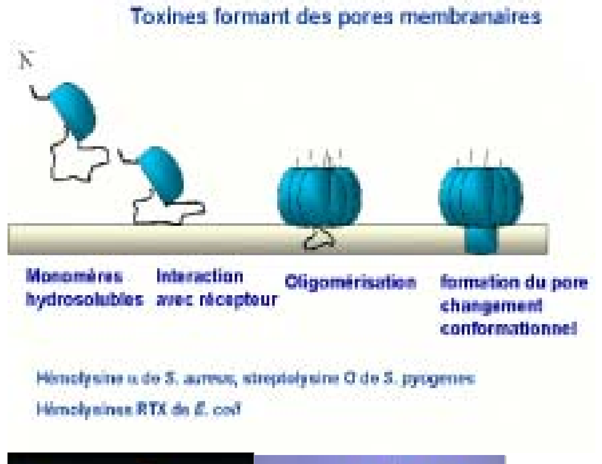
Certaines de ces toxines forment des pores et sont produites par les bactéries sous forme de monomères hydro-solubles. Après reconnaissance d'un récepteur cellulaire, elles adoptent une organisation oligomérique qui favorise l'insertion dans la membrane et la formation de pores (toxine-α du staphylocoque, SLO , hémolysines RTX de *E. coli* …). Ces toxines ont été décrites d'abord comme des hémolysines, du fait de leur action sur la paroi des globules rouges mais cette hémolyse ne participe pas au processus infectieux. La perméabilité cellulaire induit des effets indépendants de la lyse cellulaire : inhibition le fonctionnement des phagocytes, flux sélectif d'ions monovalents K^+. activation de protéases. Ces toxines sont produites en général par des bactéries à croissance extracellulaire, bien que la listériolysine O de *Listeria monocytogenes* , un pathogène intracellulaire, soit impliquée dans l'échappement du phagosome.

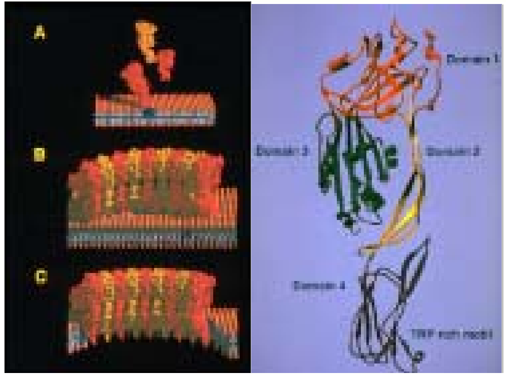


Colonies β-hémoly-tiques de *Streptococcus pyogenes* sécrétant la SLO.



Hématie exposée à la streptolysine O avec de nombreux pores





(Gauche) Polymérisation des monomères de perfringolysine PFO formant un pore. (Droite) perfringolysine cristallisée.

Toxines agissant sur des récepteurs de la membrane cellulaire

La toxine ST de *E. coli*

Une entérotoxine thermostable ST (18-20 aminoacides) est produite par certaines souches entérotoxinogènes de *E. coli.* Le récepteur de la ST est une protéine transmembranaire du pôle apical des cellules épithéliales intestinales , possédant une activité guanylate cyclase qui catalyse la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). L'augmentation de la concentration cytosolique en GMPc induit une hypersécrétion d'ions Cl par les entérocytes. Ce mode d'action de la toxine ST mime la liaison de deux peptides endogènes : la guanyline et l'uroguanyline, deux peptides de moins de 20 aa fortement homologues avec la ST. La guanyline et l'uroguanyline seraient des régulateurs paracrines de l'équilibre entre l'absorption et la sécrétion intestinale de l'eau et des ions.

Les toxines activant les lymphocytes T : les superantigènes.

Une famille d'exotoxines bactériennes appelées ''superantigènes'' constitue des mitogènes puissants des lymphocytes. Par leur activité mitogène très puissante, ces superantigènes interviennent dans plusieurs situations en pathologie humaine. L'interaction du récepteur des lymphocytes T avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II présentant les peptides antigéniques est la première étape de la réponse immunitaire spécifique. Les superantigènes s'associent aux molécules du CMH de classe II sans subir d'apprêtement sous forme de peptides. Cette liaison permettrait sa reconnaissance par l'ensemble des lymphocytes T utilisant, dans la composition de la chaîne β de son récepteur pour l'antigène, un même gène Vβ . Un superantigène activerait ainsi toute une famille de lymphocytes T différents utilisant un gène Vβ particulier chez un individu.

Les principaux superantigènes bactériens

- les entérotoxines staphylococciques (A, B, C, D et E) à l'origine d'intoxications alimentaires à *Staphylococcus aureus*,
- La toxine du syndrome de choc toxique (TSST1) produite par les staphylocoques est responsable de la survenue de chocs septiques consécutifs à l'utilisation de tampons hygiéniques.
- Les toxines érythrogènes (exotoxines AB C) de *Streptococcus pyogenes* sont à l'origine de la scarlatine.

Toxines à mode d'action intra-cellulaire

Ces toxines sont des enzymes organisées en plusieurs domaines : un domaine catalytique A qui porte l'activité toxique et un ou plusieurs domaines B assurant la reconnaissance cellulaire et permettant la translocation transmembranaire du fragment A. Ceci permet l'attachement, la translocation et la reconnaissance de la cible intracellulaire. On décrit 5 activités enzymatiques : ADP-ribosyl-transférase, ARN-glycosi-dase, glucosyl-transférase, Zn-métallo-protéases, adénylcyclase déamidase.

Toxines à activité ADP-ribosyl transférase

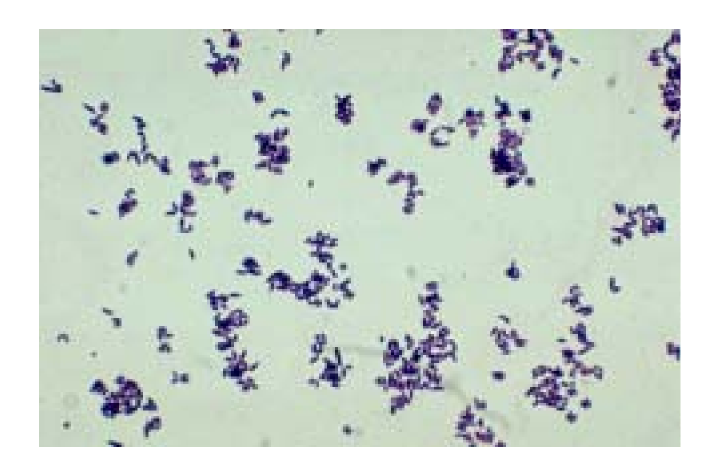
La toxine de la diphtérie. La diphtérie est une toxi-infection associant une angine pseudo-membraneuse sévère à des signes d'intoxication. Cette angine peut évoluer vers le croup par extension des fausses membranes au larynx.. Les signes d'intoxication dus à la toxine pantrope sont cardiaques, neurologiques, digestifs, rénaux et hémorragiques.

Angine diphtérique à fausses membranes obstruant la gorge.

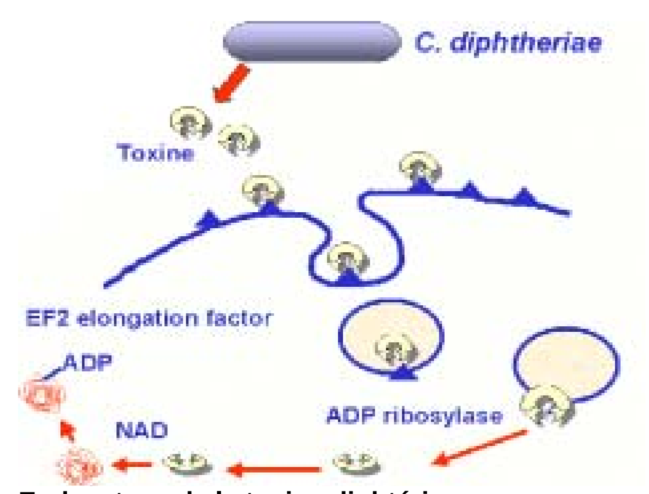




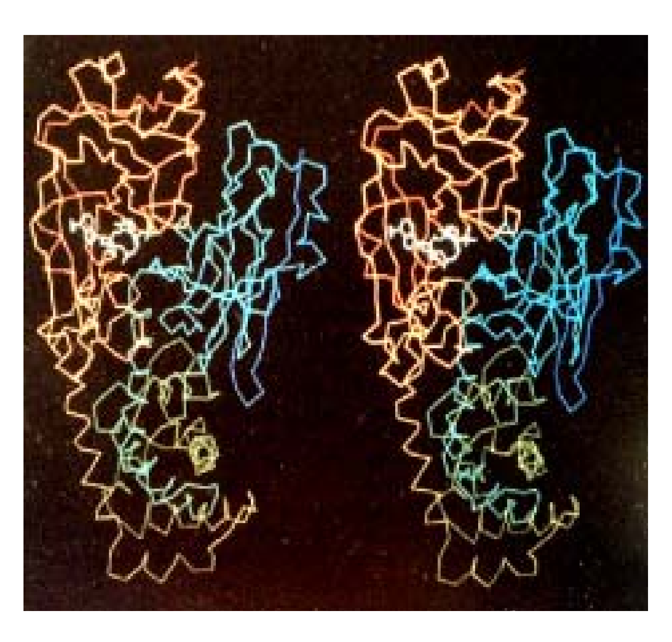
Trachéotomie pour un croup lors d'une diphtérie



Corynebacterium diphtheriae: bacille à Gram+



Endocytose de la toxine diphtérique



La toxine produite par *Corynebacterium diphteriae*, le germe responsable de la diphtérie, est codée par un phage. Cette toxine est synthétisée sous forme d'un peptide précurseur de 53 kDa activé par clivage en deux sous-unités A et B associées par un pont disulfure. La sous-

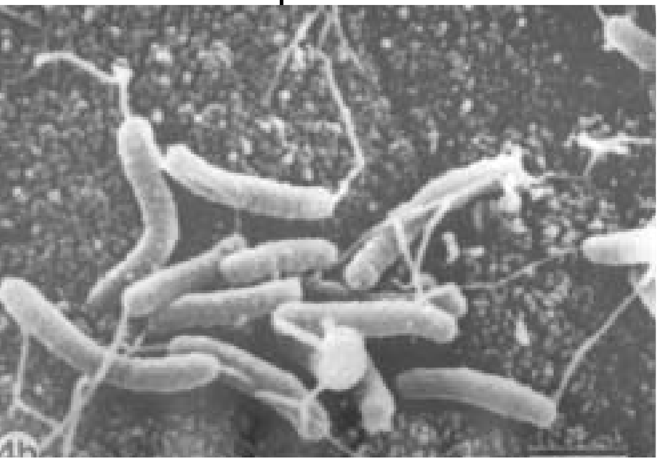
unité B permet la liaison à la cellule avec un récepteur membranaire : le précur-seur de l'*heparin-binding epidermal growth factor*, ou HB-EGF. La toxine est ensuite internalisée par endocytose. La baisse progressive du pH des endosomes change sa conformation, ce qui permet à la sous-unité catalytique A de transloquer vers le cytosol . La toxine diphtérique est une ADP ribosyl transférase active sur la diphtamine du facteur EF2 (liant le guanosine triphosphate, ou GTP), un des facteurs d'élongation de la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes. L'inhibition de la synthèse protéique est à l'origine de la mort de la cellule. L'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* présente la même activité ADP ribosyl transférase dirigée contre le facteur EF2. Son rôle dans la pathogénie de l'infection reste inconnu.

NAD^+ + EF2 $\rightarrow$ ADPR-EF2 + Nicotinamide + H^+

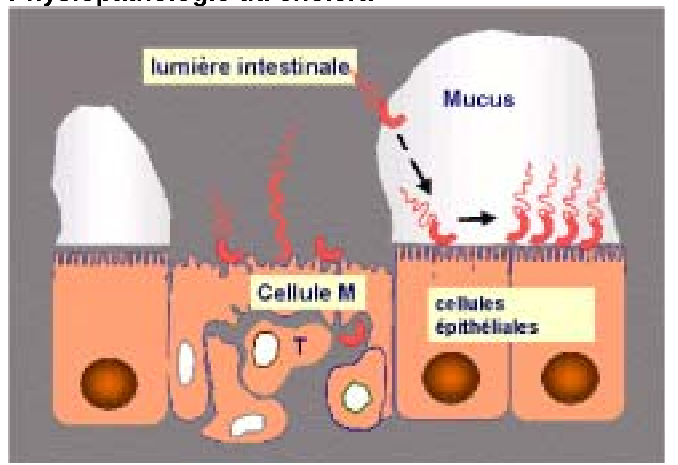
La toxine du choléra

Le choléra est une maladie diarrhéique grave évoluant par épidémies et due à un bacille Gram négatif en virgule *Vibrio cholerae*. Le syndrome diarrhéique est lié à la sécrétion de la toxine cholérique. Les bactéries adhérent aux entérocytes et sécrètent localement la toxine cholérique. Ses gènes sont portés par le phage ctx□ . Elle est constituée de 2 sous-unités A et B codées par deux gènes distincts *(ctxA et ctxB)*. La toxine cholérique est composée d'une sous-unité A de 27 kDa qui s'associe à un pentamère de sous-unités B de 11,7 kDa

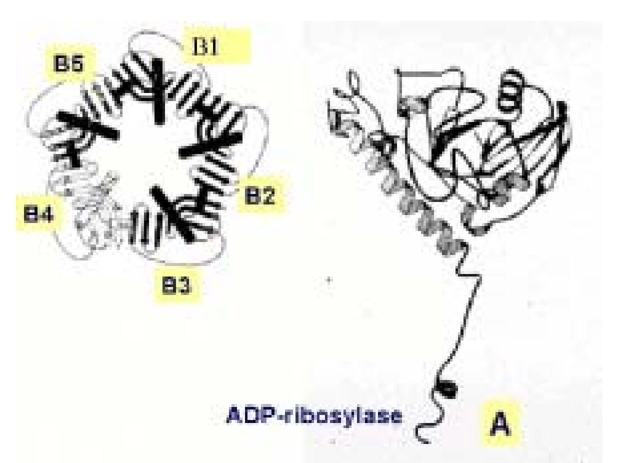
***Vibrio cholerae* sur l'épithélium intestinal**



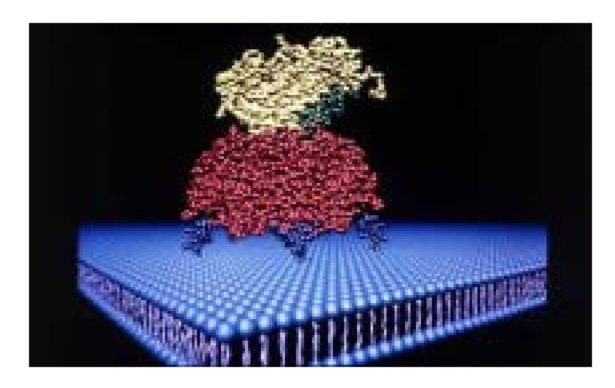
Physiopathologie du choléra

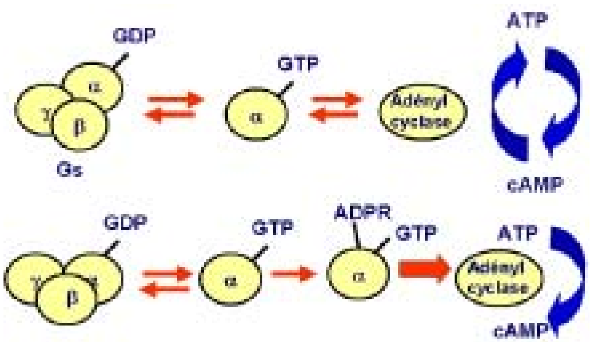


Le fragment A est clivé en deux fragments A1 et A2 reliés par un pont disulfure. Les sous-unités B reconnaissent le ganglioside GM1, un glycolipide ubiquitaire de la surface des cellules cibles. Une fois transloquée, la sous-unité A1 est capable d'ADP ribosyler la sous-unité □ de la protéine Gs (Arg 201), qui réduisant l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine et induit l'activation constitutive de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc dans l'entérocyte. Il en résulte une hypersécrétion d'eau et d'ions chlorures par l'épithélium intestinal.



Les sous-unités A (fixation) et la sous-unité B (proenzyme ADP-ribosylase)


Fixation de la toxine diphtérique sur la membrane cellulaire aux gangliosides GM1



Mécanisme d'action de la toxine cholérique sur la sous-unité α de la protéins Gs

La toxine de la coqueluche

La toxine pertussique appartient à la famille des toxines AB_5 . C'est une ADP ribosylase ayant pour cible la sous-unité de la protéine Gi . L'ADP ribosylation de la Cys352 bloque l'interaction de Gi avec son récepteur.

Autres toxines ADP ribosylantes

Deux toxines, C2 et C3, produites par *Clostridium botulinum* sont des ADP ribosyl transférases dirigées respectivement contre l'actine (ADP ribosylation des isoformes non musculaires d'actine), et les petites protéines G de la famille de Rho (remaniement profond du cytosquelette d'actine). *P. aeruginosa* produit aussi l'exo-enzyme S (ExoS), une ADP ribosylase sécrétée au contact de la cellule eucaryote grâce à une sécrétion de type III, qui favoriserait l'invasion

Toxines à activité ARN glyco-sidase

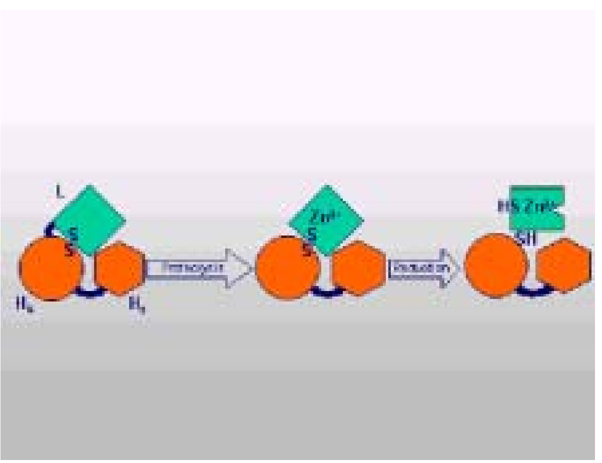
La shiga toxine et les toxines *shiga-like* (vérotoxines) sont des facteurs de virulence respectifs des shigelles et des *E. coli* entéro-hémorragiques, les EHEC O157:H7 responsables de la colite hémorragique et du syndrome hémolytique et urémique. Ces toxines sont des ARN glycosidases clivant la liaison N-glycosidique de l'adénosine en position 4324 de l'ARN ribosomal 28S, d'où une inactivation du ribosome et un arrêt de la synthèse protéique .

Toxines à activité glucosyl transférase

Les souches de *Clostridium difficile*, qui sont à l'origine des colites pseudo-membraneuses, produisent deux toxines, constituées chacune d'une chaîne peptidique, de 308 et 270 kDa. Elles induisent la désagrégation du réseau de microfilaments d'actine des cellules épithéliales. Dans l'entérocyte, un anneau de filaments d'actine présent au pôle apical contrôle l'ouverture et, donc, la perméabilité des jonctions serrées (les *tight junctions*) qui existent entre les cellules épithéliales intestinales. Les toxines A et B de *C. difficile* sont à l'origine d'un état d'hyperperméabilité paracellulaire. Ces toxines inactivent les petites protéines G de la famille de Rho (Rho, Rac et Cdc42) par glucosylation. Dans l'intestin, l'inactivation de Rho produit l'ouverture de la voie paracellulaire , ce qui est à l'origine de la diarrhée de *C. difficile* et de l'exsudat inflammatoire à l'origine des membranes.

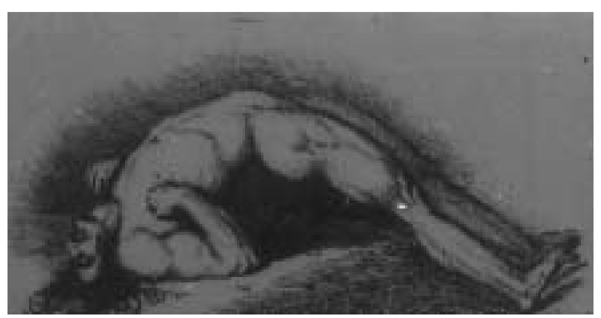
Métalloprotéases à Zn^{2+}

Le tétanos et le botulisme sont des pathologies paralysantes causées par des neurotoxines produites par des bactéries anaérobies du genre *Clostridium.* La symptomatologie est due à des neurotoxines qui protéolydsent les protéines fusogènes des vésicules synaptiques portant les neurotransmitteurs.



Toxine tétanique

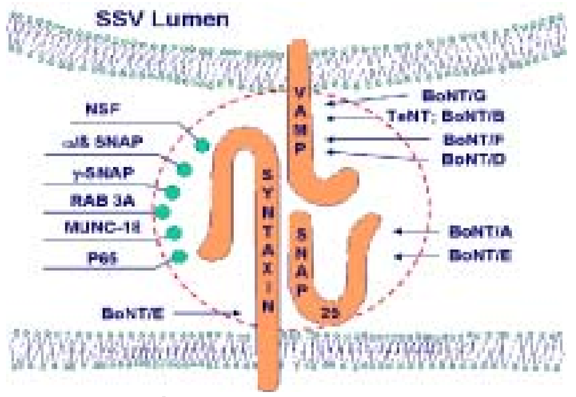
La toxine du tétanos



Attitude en opisthotonos du tétanos

La toxine tétanique est produite par *Clostridium tetani*. La bactérie pénètre par une plaie cutanée et libère la toxine tétanique. Celle-ci reconnaît les gangliosides GT1 GD1b des fibres présynaptiques des terminaisons nerveuses périphériques. Ces fibres opèrent un transport axonal rétrograde de la toxine, ce qui a pour effet de l'amener dans le système nerveux central. La toxine tétanique bloque la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs (GABAergiques et glycinergiques) en inhibant la fusion des vésicules portant l'acétylcholine, provoquant l'apparition de spasmes. La toxine tétanique est une métalloprotéase Zn^{2+}dépendante, clivant la synapto-brévine, une protéine de la membrane des vésicules de neurotransmetteurs.



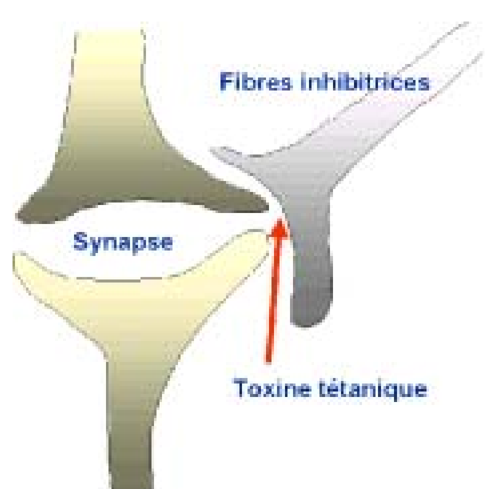


Site de protéolyse en fonction des toxines

La toxine du botulisme

Le botulisme est dû à une inhibition du fonctionnement des fibres nerveuses périphériques cholinergiques innervant les muscles squelettiques. Il en résulte un tableau de paralysie flasque. L'entrée de la toxine se fait par voie digestive après absorption de conserves alimentaires. Les toxines botuliques produites par divers sérotypes A, B, C, D, F et G de *C botulinum* possèdent un mode d'action voisin de celui de la toxine tétanique. Les toxines se fixent sur les gangliosides GD1b des neurones moteurs des muscles striés, des neurones sympathiques et parasympathiques. Ces

protéines de fusion impliquées dans l'exocytose sont des cibles des toxines botuliques (protéolyse de la synaptobrévine, syntaxine, ou SNAP-25): (1) la synapto-brévine de la membrane des vésicules des neurotransmetteurs est la cible des toxines B, D, F et G : (2) Les toxines A, B et C clivent la SNAP-25 et la syntaxine, qui sont présentes sur la membrane plasmique présynaptique. Ces protéines inhibent la fusion des vésicules (acétylcholine) qui jouent un rôle important dans la neurosécrétion et le trafic des vésicules dans les cellules .



Action de la toxine tétanique sur les fibres nerveuses inhibitrices

Toxines à activité adénylate cyclase

Les toxines du charbon et de la coqueluche

Le charbon est une maladie septicémique due à *Bacillus anthracis*. Cette bactérie colonise les plaies et produit séparément des peptides toxiques qui portent l'activité catalytique et reconnaissent des récepteurs exposés sur la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. L'antigène protecteur PA forme un heptamère capable de transloquer les activités enzymatiques de EF et LF. Le facteur œdémateux *(oedema factor)* est une adénylate cyclase dépendante de la calmoduline , et le facteur létal *(lethal factor)*.

Bordetella pertussis sécrète aussi une adénylate cyclase de même type. En augmentant la concentration en AMPc du cytosol des cellules, cette toxine inhibe la phagocytose et la production de radicaux libres par les macrophages.

Toxines à activité déamidase

Le facteur cytotoxique nécrosant (CNF) est une toxine sécrétée par certaines souches de *E. coli* uropathogènes et entéropathogènes. Le CNF provoque une augmentation du nombre des fibres de tension. La toxine active la protéine G Rho par activité déamidase sur le résidu Glu 63. Rho perd son activité GTPasique. La toxine dermonécrotique de *B. pertussis* présente la même activité déamidase dirigée sur Rho .

Conclusion

La connaissance actuelle du mode d'action d'un grand nombre de toxines microbiennes a permis de constater que les protéines G sont fréquemment la cible de toxines microbiennes. Pour détourner les voies de transduction cellulaire, l'évolution bactérienne a privilégié un mode d'action sur les protéines G plutôt que sur les kinases ou sur d'autres enzymes. L'intérêt de l'étude des toxines ne se limite pas à l'explication des pathologies. Ce sont des outils de biologie cellulaire et des thérapies contre diverses maladies (vaccins, immnunotoxines).

La variation antigénique

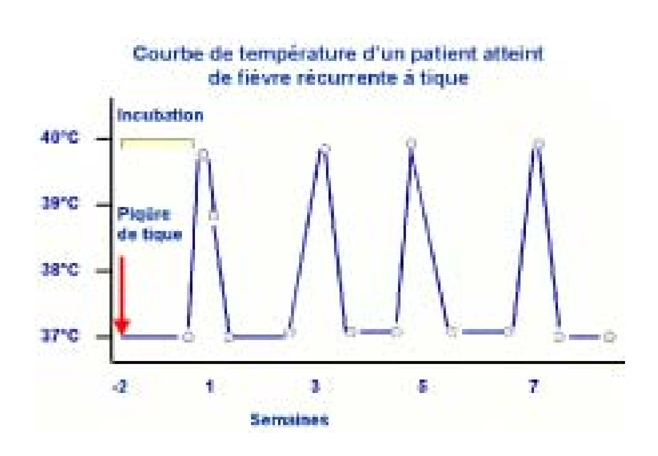
Les bactéries virulentes cherche à échapper aux défenses de l'hôte soit pour les bactéries à croissance intracellulaire en atteignant des sites inaccessibles (''sanctuaire'') au système immunitaire, soit pour les bactéries à croissance extracellulaire par production de toxines qui détruisent les cellules immunes et les protéines de l'inflammation et les immunoglobulines.

Définition et prérequis

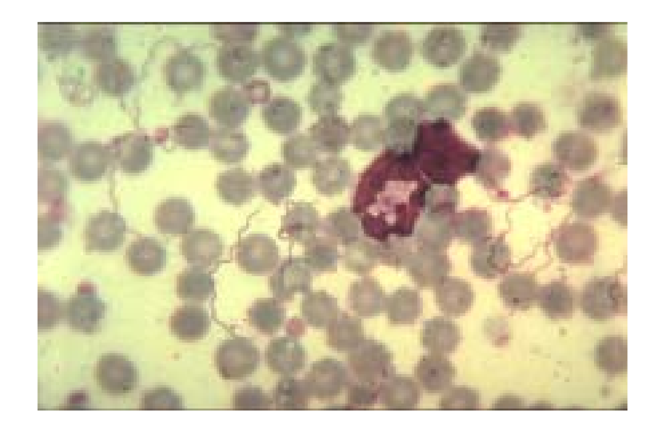
Certains agents pathogènes à multiplication extracellulaire (bactéries, parasites) sont capables de se ''métamorphoser '' au cours du processus infectieux chez un individu donné. Les virus également peuvent ''varier'' au cours de l'infection par dérive génétique (*drift*) du fait de l' accumulation de mutations modifiant les cibles, comme c'est le cas par exemple du VIH qui rapidement se diversifie chez un patient donné. Ce mécanisme original de survie de certaines bactéries extracellulaires est appelé variation antigénique qui est la capacité d'une bactérie de modifier de façon itérative certains antigènes majeurs exposés à leur surface au cours du processus infectieux. Cette ''métamorphose'' entraîne une persistance de l'infection car le système immunitaire doit pour chaque nouvel antigène induire une nouvelle réponse spécifique. Cette stratégie est aussi utilisée par certains parasites (*Trypanosoma gambiense…*).

La variation antigénique nécessite un certain nombre de prérequis. Le parasite doit posséder de nombreux gènes codant pour des antigènes « exposés » (immunodominants) sans relation antigéniques croisés (multiples gènes non alléliques) pour permettre les réarrangements de ces gènes au moment opportun. La cinétique du remplacement doit être programmée en sorte que le remplacement de la population des bactéries responsables de l'infection doit apparaître dans une sous-population minoritaire avant que la population dominante soit détruite. On constate qu'il existe une expression ordonnée et synchrone des antigènes de surfaces : par exemple, les antigènes A d'une bactérie pathogène donnée sont remplacés par les antigènes B, puis C, puis D, puis E… Cette séquence qui survient chez un patient est toujours la même , pour une souche donnée quel que soit le patient. Voici quelques exemples de variation antigènique chez les bactéries.

Borellia reccurentis, agent des fièvres récurrentes



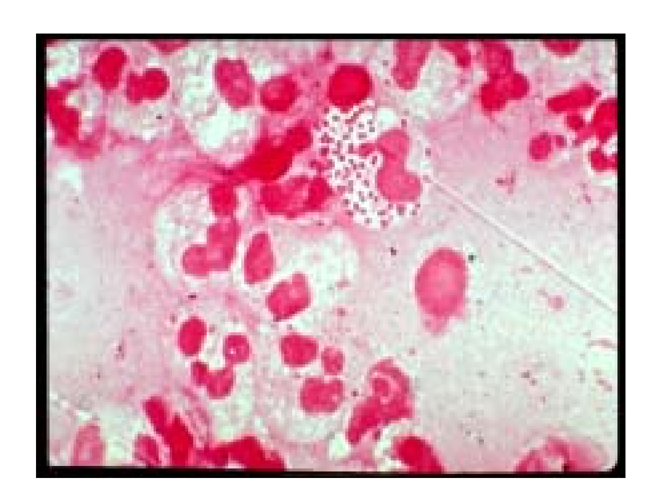
Les *Borrellia* sont des spirochètes responsables de fièvres récurrentes à poux et à tiques. La maladie évolue par épisodes fébriles itératifs stéréotypés au cours desquels les bactéries sont visibles dans le sang puis disparaissent pour à nouveau réapparaître au cours des récurrences. Ce phénomène a été étudié en utilisant l' espèce *Borrelia hermsei* pathogène pour l'animal de laboratoire. Il a été montré que chaque épisode fébrile correspond à des bactéries portant des antigènes de surface différents.





Spontanément, à chaque génération, des ''variants'' apparaissent à un taux de 10^{-3} 10^{-4} par génération. *B hermsei* est recouvert d'une protéine immunodominante appelée VMP (*Variable Major Protein*). Lors de la primo-infection, une première VPM est exprimée à la surface des bactéries circulantes qui sont éliminées en quelques jours par des anticorps anti-VMP. Puis les bactéries réapparaissent avec une nouvelle VMP sans relation antigénique avec la précédente VMP et ainsi de suite. Le gène codant pour la VMP est localisé à un site d'expression où se trouve un promoteur. Lors de la variation antigénique, ce gène est remplacé à ce site d'expression par duplication-transposition (*gene conversion*) par un nouveau gène. *B hermsei* possède 27 gènes codant pour au moins 26 sérotypes de VMP. Ce pool de gènes silencieux complets (sans promoteur) est localisé sur un plasmide linéaire de 30 kb.

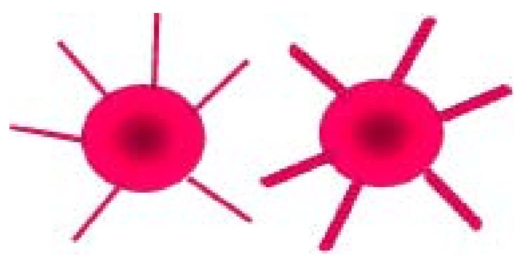
Neisseiria gonorrhoeae et N. meningitidis,



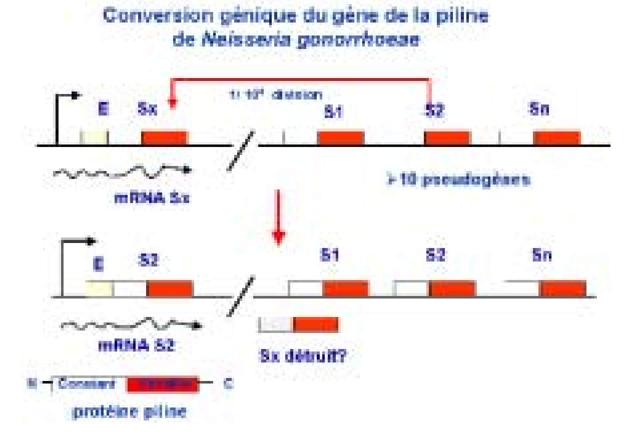
N gonorrhoeae et *N. meningitidis* sont les agents d'uréthrites aigues et de méningites purulentes, respectivement. Ils sont soumis à variation antigénique pour de nombreux antigènes. La gonococcie non traitée donne un écoulement purulent qui a tendance à persister pendant plusieurs semaines. à tendance. Cette persistance serait favorisée par un phénomène de variation antigénique qui concerne plusieurs antigènes de cette bactéries, notamment la piline et la protéine Opa.

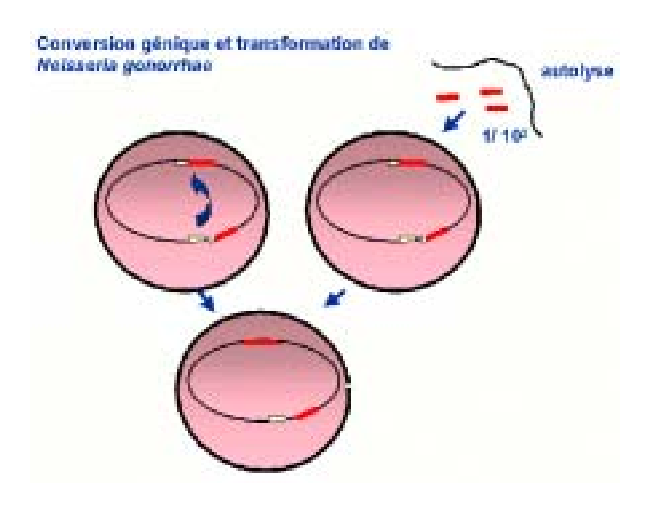
La piline est une protéine de 17-21 kDa présentant une région N terminale constante et une région C terminale variable. En se polymérisant, la piline constitue les pili (dit de type IV) de *N gonorrhoeae,* structures filamenteuses favorisant l'adhésion de cette bactérie aux cellules épithéliales. Le gène de la piline est transcrit à un site d'expression avec un promoteur et le gène complet de la piline. Il existe par ailleurs au moins 10 pseudo-gènes (gènes tronqués) codant pour la partie variable de la piline. Au cours du phénomène de variation antigénique de la piline, demeure au site d'expression le promoteur et le segment de gène codant pour la partie constante. Les réarrangements avec les pseudo-gènes se font donc au site d'expression en reconstituant un nouveau gène fonctionnel. La fréquence de ces recombinaisons réciproques est de 10^{-3} par génération. Un 2ème mécanisme peut survenir : la

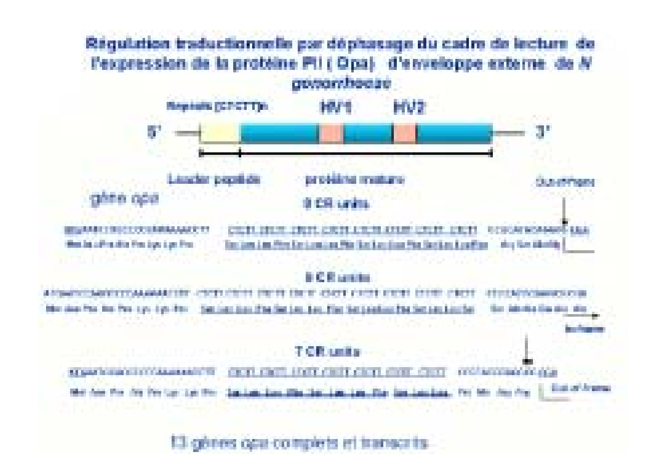
transformation in vivo à partir du DNA libéré d' autres bactéries lysées dans les tissus.



Variation antigénique de la piline







Opa (dite d'opacité ou PII) est une protéine d' enveloppe externe contribuant à l'adhérence et à l'invasion de *N* gonorrhoeae. Cette protéine codée par le gène *opa* est capable de donner une variation antigénique. Il existe dans le génome de ce pathogène de nombreux gènes complets et transcrits (environ 13). Ces gènes sont soumis à une régulation traductionnelle par décalage du cadre de lecture au niveau des mRNA dans la partie correspondant à la séquence-signal du gène.

Parasitisme intracellulaire des bactéries

Définition du parasitisme intracellulaire

Les microorganismes pathogènes, au cours de l'évolution, ont élaboré à des mécanismes très sophistiqués qui leur permettent de survivre dans les tissus au formidable système de défenses immunitaires mis en œuvre dés qu'un microorganisme pénètre dans les tissus.

Les principales stratégies de survie sont :

(1) La production de toxines qui détruisent les cellules du système immunitaire et éventuellement les tissus permettant ainsi la dissémination des microorganismes.

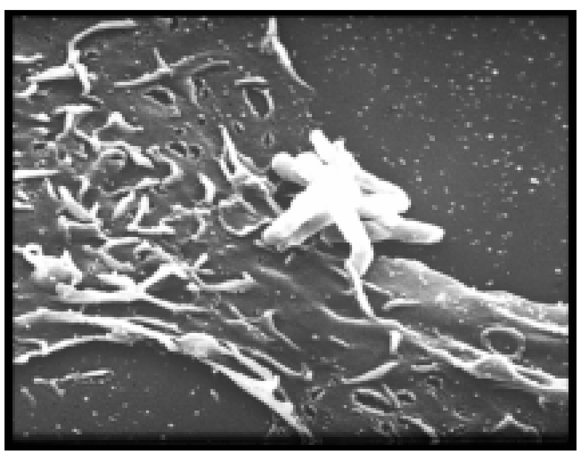
(2) Le camouflage, c'est-à-dire le mimétisme moléculaire qui permet aux micro-organismes de ne pas être reconnu facilement par les défenses immunitaires.

(3) La métamorphose c'est à dire un changement brutal des antigènes exposés en surface des germes (variation antigénique qui permet la survie « itérative » du microorganisme dans le micro-environnement de l'hôte).

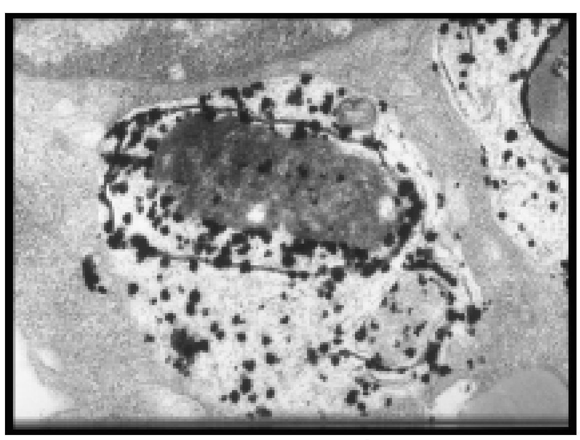
(4) La recherche d'un sanctuaire c'est à dire la quête d'un lieu où le système immunitaire ne « verra « pas le microorganisme qui survit dans même de l'hôte et parfois même dans les cellules du système immunitaire.

Le parasitisme intracellulaire est défini par la capacité d'un germe pathogène de trouver sa source de nutriments et sa niche écologique à l'intérieur même des cellules de l'organisme, restant ainsi à l'abri des défenses immunitaires de l'hôte. Lors de leur vie intracellulaire, ces microorganismes vont de plus être difficilement accessibles aux drogues telles que les antibiotiques. Le système immunitaire, pour se déloger de leur niche écologique, devra mettre en œuvre une immunité cellulaire T souvent difficile à induire, expliquant la difficulté de la vaccination contre les pathogènes intracellulaires.

Lors du contact avec les macrophages, la plupart des bactéries que nous rencontrons sont rapidement phagocytées et détruites grâce aux mécanismes bactéricides des phagosomes (*burst* oxydatif et nitré et enzymes lysosomiaux).



Bacillus *subtilis* sur un macrophage



Fusion phagolysosomiale détruisant B subtilis

Il existe une très grande diversité phylogénique des pathogènes à croissance intra-cellulaires. Certains sont devenus des parasites intracellulaires obligatoires totalement adaptés à la vie intracellulaire, incapable de survivre à l'extérieur des cellules. Outre les virus, ces parasites sont habituellement des protozoaires ou des bactéries qui ont eu une longue vie commensale au contact de l'hôte auquel ils se sont parfaitement adaptés. Souvent ils ne donnent que des lésions minimes chez l'hôte qui assure en définitif leur survie. D'autres microorganismes à croissance intracellulaires, retrouvés dans l'environnement comme saprophytes, ont élaborés des mécanismes moléculaires leur permettant de lutter contre leurs prédateurs naturels dans l'environnement. Leur parasitisme intracellulaire chez l'hôte infecté apparaît donc comme un accident plutôt que

comme une finalité. C'est le cas par exemple, de *Listeria monocytogenes* ou *Legionella pneumophila* qui ont élaborées des mécanismes de survie intracellulaire pour lutter contre les amibes de l'environnement. Les étapes du parasitisme intracellulaire sont l'entrée, la survie dans les phagosomes, la multiplication intracellulaire, la dissémination et la sortie de pathogènes intracellulaires.

Pathogènes intracellulaires

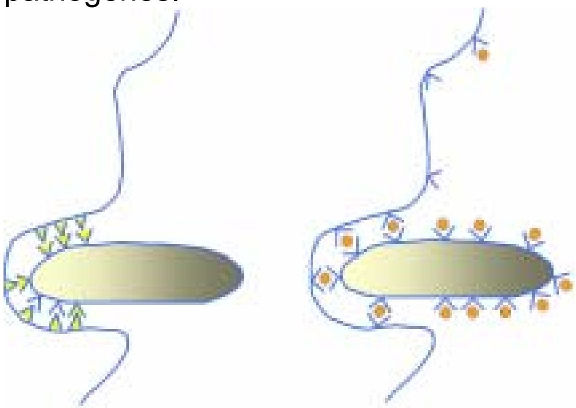
agents infectieux	spectre d'hôte	réplication intracellulaire obligatoire	réplication intracellulaire facultatif
Virus Viroïdes	Bactéries champignons Plantes Animaux	tous les virus	-
Bactéries Listeria	Bactéries champignons	Chlamydia, Rickettsia, Ehrlichia, Coxiella,	Legionella, Mycobacterium Salmonella, Shigella, Yersinia, Brucella, Bartonella, Coxiella…
Champignons	Plantes Animaux	H. capsulatum, P. carinii	Candida albicans, Cryptococcus neoformans
Protozoaires	Animaux	Cryptosporidium, Microsporidia	Plasmodium, Babesia, Leishmania, Toxoplasma, Trypanosoma

Enfin, les pathogènes intracellulaires ont un impact considérable en santé publique puisque outre les virus, dans les grandes causes de mortalité de la population mondiale, actuellement figure les Mycobactéries, les *Plasmodium*, les Trypanosomes, les Leishmanies.

Mécanismes du parasitisme intracellulaire

L'entrée

L'entrée dans les cellules d'un microorganisme pathogène implique une première étape très spécifique où interagissent une molécule réceptrice de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (glycolipides, glycoprotéines…) et une structure moléculaire exprimée à la surface du parasite. Dans certains cas, cette interaction est indirecte, impliquant une opsonisation préalable des germes par des molécules libres dans les tissus (C3, fibronectine, anticorps…). Ces opsonines recopnnaissent leurs propres récepteurs à la surface des cellules (CR3 pour le C3, RFc pour les Ig…). Ces interactions ligands récepteurs vont cibler les germes vers certains types de cellules exprimant ces récepteurs : macrophages, cellules épithéliales, endothéliales, parenchymateuses. Ceci explique la spécificité d'hôte et de tissus des germes pathogènes.



Interactions directe et indirecte entre les bactéries et les cellules

Cette interaction moléculaire spécifique entraîne une phagocytose induite, c'est-à-dire la capacité pour la cellule-hôte, qu'il s 'agisse de macrophages professionnels (monocytes, polynucléaires, macrophages fixes des tissus…) ou non professionnels (cellules épithéliales, endothéliales, parenchymateuses) de phagocyter activement le microorganisme.

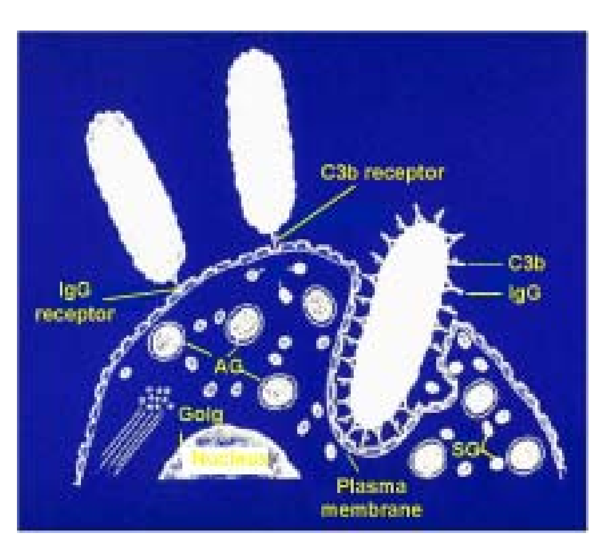
Ce processus peut en effet être bloqué par un poison de cytosquelette, la cytochalasine D. L'étape d'interaction moléculaire permettant l'adhésion de microorganisme à la cellule-hôte ne suffit pas toujours à l'entrée, et il est probable que la multiplicité de l'interaction (par un mécanisme de fermeture-éclair ou *zipper-mechanism*) induit la polymérisation de l'actine et la phagocytose.

Quelques microorganisme échappent à ce mécanisme très général de phagocytose induite, soit parce qu'il s'attache directement à la membrane cytoplasmique sans être de réels parasites à croissance intracellulaire (mycoplasme), soit parce qu'ils sont directement injectés à l'intérieur du cytoplasme par le microorganisme (microsporidies), soit parce qu'ils sont partiellement intra-cellulaire comme c'est le cas des cryptosporidies, ou enfin parce qu'ils entrent activement dans la cellule hôte

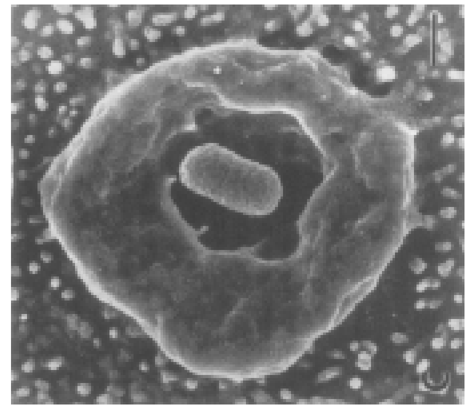
(toxoplasme). Seuls seront traitées ici les bactéries.

Principales bactéries intracellulaires selon leur site de réplication

Propriétés	Sites de réplication	Bactéries
Pathogènes ubiquistes	Macrophages	*Listeria monocytogenes*
Pathogènes spécifiques	Erythrocytes	*Bartonella*
	Granulocytes MacrophagesMonocytes	*Ehrlichia* *Mycobacteria, Legionnella, Salmonella*
	Cellules endothéliales	*Rickettsia, Coxiella, Brucella, Baronella, Rochalimea, Listeria.*
	Cellules parenchyma-teuses	Hépatocytes *Listeria*
	Cellules épithéliales	Entérocytes *Shigella,Listeria* *cellules conjonctivales et génitales C trachomatis)* cellules respiratoires *C psittaci* *C pneumoniae*



Phagocytose par fermeture éclair

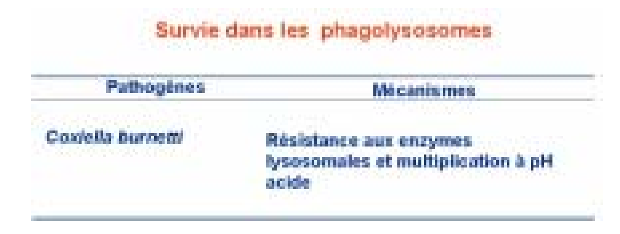

Entrée de Salmonella dans un macrophage

La survie intracellulaire

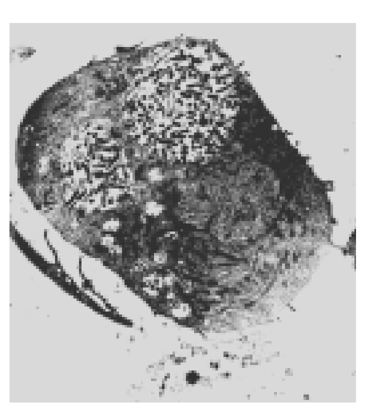
Dès que les bactéries sont phagocytées, elles sont séquestrées dans des phagosomes où sont déclenchés des mécanismes microbicides puissants liés à des enzymes de la membrane de ces vacuoles (production de métabolites toxiques, O2, NO2…) et à fusion phagolysosomale qui déversent dans les phagosomes des enzymes lysosomiaux. Schématiquement, on peut opposer les microorganismes qui survivent dans le phagosome à ceux qui survivent dans le cytoplasme.

Survie dans le phagosome

Certains pathogènes peuvent résister dans le phagolysosome, donc après fusion entre les lysosomes et le phagosome, survivant dans un environnement fortement acide (*Coxiella*).


Survie dans les phagolysosomes

Pathogènes	Mécanismes
Coxiella burnetti	Résistance aux enzymes lysosomales et multiplication à pH acide



***Coxiella* dans une cellule endothéliale**

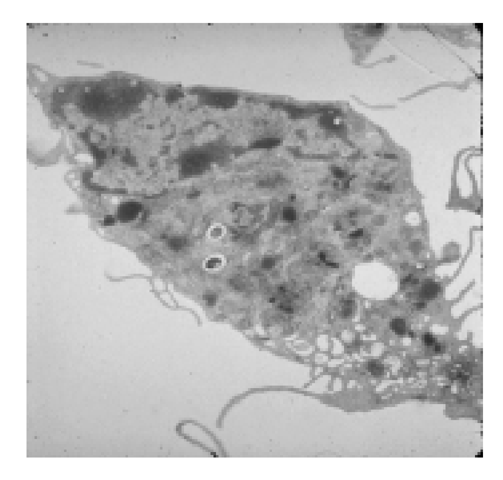
D'autres bactéries inhibent la fusion phagolysosomale (*Chlamydia, Legionnella*, *Mycobacterium*). Le mécanisme de cette inhibition de fusion est mal connu. Dans tous les cas, ces microorganismes sont résistantes aux métabolites toxiques et ne sont pas digérés par les enzymes lysosomiales du fait de l'inhibition de fusion.

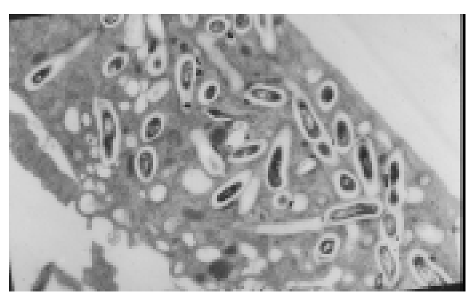
Survie dans les phagosomes ou les endosomes

Pathogènes	site de réplication	mécanismes
Chlamydia	Endosome	Inhibition de la fusion lysosome-endosome
Mycobacterium *Legionella*	Phagosome	Inhibition de la fusion lysosome-phagosome

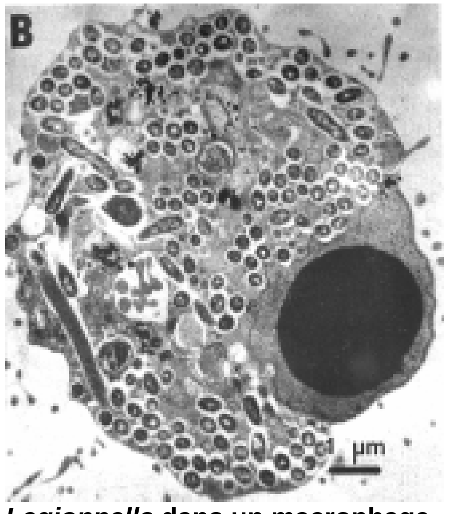
Entrée dans les phagocytes professionnels (macrophages-monocytes)

Pathogènes	Ligands	Récepteurs
L. pneumophila	C3bi	CR3
M. tuberculosis	C3bi, iC3b	CR3, CRI
M. leprae	C3bi, iC3b	CR1, CR3

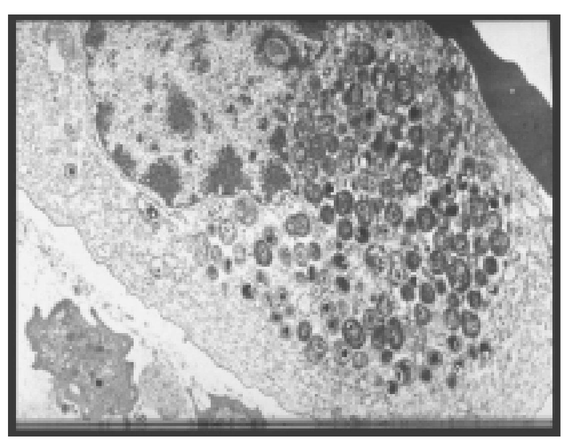




Croissance de mycobactéries dans des macrophages



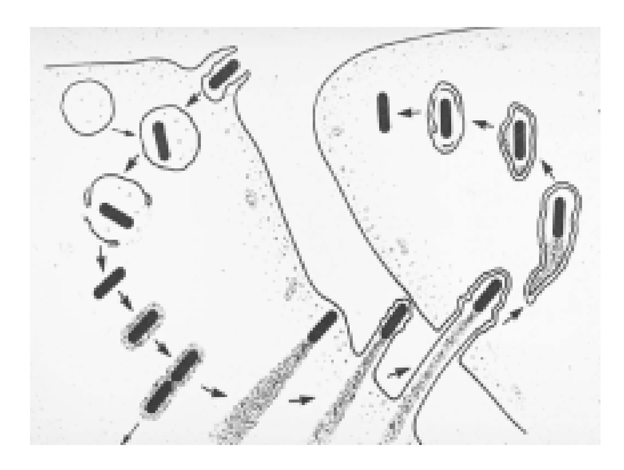
***Legionnella* dans un macrophage**

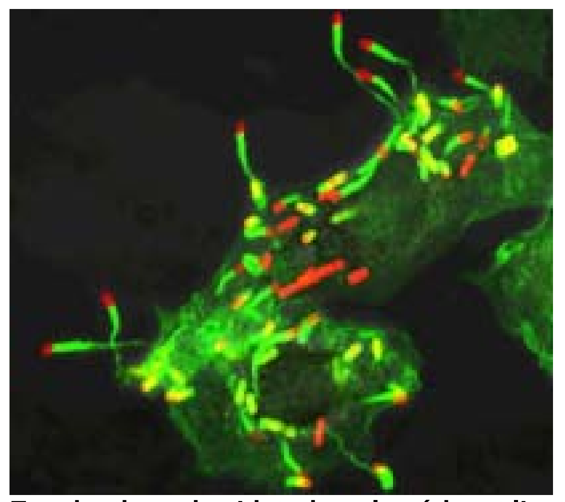


***Chlamydia* trachomatis dans une cellule épithéliale**

Survie dans le cytoplasme

Certaines bactéries échappent au phagosome après leur entrée en détruisant la membrane vacuolaire qui les entoure. Cet l'échappement du phagosome permet aux bactéries de se retrouver libres dans le cytoplasme où elles sont à l'abri des mécanismes bactéricides mis en œuvre dans les cellules. C'est le cas de *Listeria monocytogenes* qui détruit la vacuole de phagocytose par son exotoxine (la listériolysine O et des phospholipases, des Shigelles par une hémolysine et des Rickettsies par une phospholipase. Ces bactéries intracytoplasmiques polymérisent l'actine et se meuvent dans le cytoplasme, formant des évaginations cellulaires permettant aux bactéries de gagner les cellules adjacentes sans exposition au milieu extracellulaire.


Cycle de multiplication de *L monocytogenes*


Evaginations des Listeria polymérisant l'actine


Comète d'actine

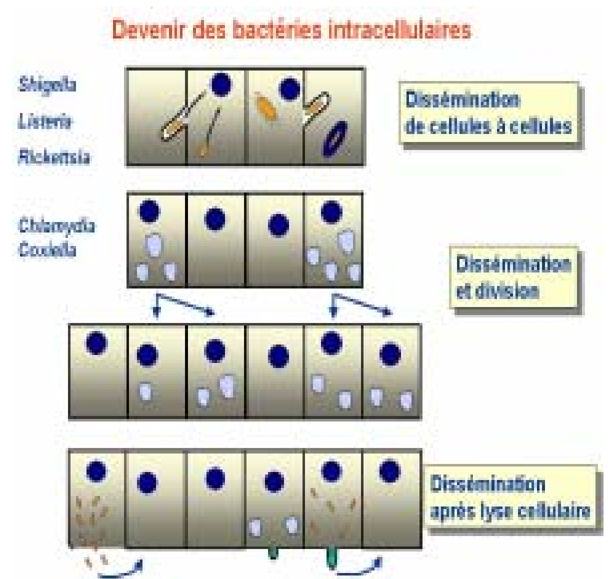

Pénétration dans une cellule adjacente

Multiplication intracellulaire

Quelque soit le mécanisme de survie dans les phagosomes ou le cytoplasme, les bactéries font se multiplier et éventuellement disséminer d'une cellule à l'autre avant de détruire la cellule qui les a hébergés. La plupart des parasites intracellulaires obligatoires (excepté les virus) ne dépendent habituellement pas de la cellule-hôte pour la synthèse de leurs macromolécules mais en dépendent pour la génération d'énergie (ATP) et, dans certains cas, pour la synthèse de certains précurseurs (aminoacides, sucres, nucléotides, vitamines). Au contraire, les bactéries intracellulaires facultatives ne dépendent pas de la cellule-hôte pour la synthèse des macromolécules ou de leurs précurseurs, ni pour la génération d'énergie.

La multiplication intracellulaire est plus ou moins importante suivant la cellule considérée et le microorganisme considéré. A titre d'exemple, Certaines bactéries atteignent des titres intracellulaires très élevés de 100 à 1000 bactéries par cellule: les *Rickettsia* à multiplication cytoplasmique, les *Coxiella* ou les *Chlamydia* à multiplication intraphagosomale. D'autres atteignent des titres plus faibles de 5 à tout au plus quelques dizaines bactéries par cellule (*Listeria mono-cyrogenes*, *M tuberculosis*…).

La conséquence de cette réplication intracellulaire est variable. Dans certains cas la parasitisme intracellulaire n'entraîne que peu de conséquences pour la cellule qui continue à survivre et même à se diviser (*Chlamydia*). Certaines cellules infectées peuvent véhiculer les bactéries pathogènes contribuant à la dissémination des bactéries dans les tissus. Dans d'autres cas, apparaissent des dysfonctionnements cellulaires par modification des membranes phagosomales et cytoplasmiques avec expression d'antigènes microbiens. Enfin souvent, la multiplication rapide des bactéries à l'intérieur des cellules entraîne la lyse des cellules et donc la dissémination des micro-organismes.



Dissémination des parasites dans l'hôte du microorganisme

Certains pathogènes à multiplication cytoplasmique (*Listeria, Shigella, Rickettsia*) sont capables de disséminer de cellules à cellules à l'instar des virus, en utilisant leur capacité de polymériser l'actine et de se mouvoir à l'intérieur de la cellule-hôte. Ces bactéries sont propulsées au sein d'évaginations et passent de cellules à cellules sans être exposées au milieu extracellulaire. Dans les cellules adjacentes ainsi infectées, les bactéries sont encloses dans une double membrane d'où elles sortiront à nouveau pour recommencer leur cycle de multiplication. D'autres bactéries vont diffuser de cellules à cellules du fait de la multiplication cellulaire infectées elle-même. Ainsi les Chlamydia ou les Coxiellae qui se multiplient dans plusieurs vacuoles différentes dans une même cellule vont au cours de la division cellulaire parasiter les cellules-filles et ainsi contribuer la pérénisation de l'infection. Enfin la plupart des microorganismes vont être libérés dans l'espace extracellulaire par éclatement de la cellule ou par libération à partir des cellules en apparence intactes.

Réponse immunitaire contre les microorganismes intracellulaires

Les cellules ou les microorganismes intracellulaires induisent la présentation de peptides antigénique selon un mode de présentation cytoplasmique (classe I dépendante) ou lysosomiale (classe II dépendante). Ainsi les bactéries intracellulaires vont-elles induire une réponse immunitaire avec expansion clonale des lymphocytes B et T, notamment les lymphocytes $CD4^{+}$, et production des cytokines, (IL-1, IL-2 , TNF..). Ce mécanisme inducteur est à l'origine d'un recrutement cellulaire et d'une activation de macrophages liés à la production des lymphokines, et d'autre part à la production lymphocytes $CD8^{+}$ cytotoxiques qui ont détruisent les cellules exprimant à leur surface des antigènes microbiens. Ceci arrête pour un temps la croissance intracellulaire des bactéries qui sont ainsi exposés notamment aux anticorps et aux polynucléaires du système immunitaire. La production d'anticorps au cours des infections par des microorganismes à croissance intracellulaire peut contribuer pour une part à l'élimination des tissus de ces bactéries en particulier par leur rôle opsonisant qui cible les bactéries vers les macrophages et les polynucléaires où ils seront détruit.

Mutations bactériennes

Mutations bactériennes

La fidélité de la réplication de l'ADN, repose sur le fait que chaque brin d'ADN sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin d'ADN complémentaire. Chez les bactéries, la réplication procède par un mode semi-conservatif, c'est-à-dire que pour chaque molécule fille d'ADN, un des deux brins provient de la molécule-mère. Au cours de la réplication, le taux d'erreur par nucléotide incorporé est très faible (de l'ordre de 10^{-9} soit 1 sur 1 milliard). Une aussi grande fidélité de réplication est non seulement due à la fidélité des appariements des bases AT et CG, mais aussi à la propriété de corriger les erreurs. Les modifications du matériel génétique, survenant spontanément ou induites, sont à l'origine de mutations.

Définitions

Mutation et mutant
Elles se définissent comme des modifications de la séquence nucléotidique d'un ADN (chromosomique, plasmidique ou phagique). Le génome d'une bactérie ayant subit une mutation est donc différent de la bactérie dont elle est issue, dite parentale. Et cette modification du génotype, transmise héréditairement, n'est pas toujours associée à une modification observable du phénotype. En pratique, on parle de "bactérie mutante" lorsque la mutation a une expression phénotypique caractérisée (exemple : résistance à un antibiotique), c'est-à-dire qu'elle s'accompagne de modification(s) détectable(s) du comportement de la bactérie.

Par opposition à une bactérie mutante, une bactérie est dite de type sauvage (wild type) lorsque ses propriétés sont celles qui sont retrouvées naturellement dans l'espèce considérée (exemple : mutant de *E. coli* résistant à la streptomycine, alors que les souches sauvages de *E. coli* sont sensibles à cet antibiotique)

La fréquence de mutants est le nombre de cellules mutantes sur le nombre total de bactéries. Le taux de mutation est la probabilité qu'un événement mutationnel se produise en un intervalle de temps donné. Le taux de mutation est obtenu en mesurant la fréquence de mutant par unité de temps choisi.

Bases moléculaires des mutations

Rappel : Bases puriques = adénine (A), guanine (G) ; Bases pyrimidiques = cytosine (C), thymine (T)

Nature des mutations

Mutation ponctuelle
Il s'agit de la substitution d'une seule base qui peut se faire selon divers mécanismes
Transition : lorsqu'une base purique est remplacée par l'autre base purique, ou une base pyrimidique par l'autre base pyrimidique ;
Transversion : lorsqu'une base purique est remplacée par une base pyrimidique ou vice-versa.
Mutation par addition ou délétion d'une ou plusieurs bases, .

Mutations spontanées ou induites :
Une mutation peut survenir naturellement, ou spontanément. Il s'agit de mutations qui s'inscrivent dans le cadre de l'évolution naturelle, c'est-à-dire survenant sans l'intervention d'agent exogène et survenant de façon aléatoire sur la séquence nucléotidique. La survenue d'un tel événement est rare (la probabilité de voir apparaître une modification de la séquence d'ADN par génération cellulaire est de 10^{-8} à 10^{-11}). Il s'agit le plus souvent de mutations génotypiques sans expression phénotypique.

Les mutations induites artificiellement
Grâce à l'action d'un agent exogène, il est possible de favoriser la survenue de mutations. On parlera alors de mutations induites par un mutagène. Schématiquement les mutagènes, qu'ils soient d'origine physique, chimique ou biologique, et bien

qu'ils agissent par des mécanismes différents, ils provoquent des mutations aléatoires sur n'importe quelle partie du génome.

Agents chimiques

Les analogues de bases provoquent le changement d'une base au cours de la réplication

Exemples :

- 5 Bromouracil : Il s'agit d'un analogue de la thymine qui s'apparie avec l'adénine (mais de façon instable) et peut s'apparier avec la guanine. Ainsi, lors de la réplication, la paire adénine –thymine (A.T) est remplacée par la paire gaunine-cytosine (G.C) ; Il s'agit donc d'un mécanisme de transition (A.T → G.C ou G.C → A.T).
- 2 Aminopurine : Transition (A.T →G.C)

Les agents alkylants provoquent une altération chimique d'une base conduisant à un mésappariement et à l'apparition d'une nouvelle paire de base.

Exemples :

- Acide Nitreux : Transition (G.C → A.T et A.T → G.C)
- Hydroxylamine : Transition (G.C → A.T)
- Ethyl méthane sulfonate :

Transversion (G.C → C.G et G.C → T.A)

Transition (G.C → T.A)

Les agents intercalants doivent leur nom à leur capacité à pouvoir s'intercaler entre deux paires de bases d'un ADN. Ils créent des décalages au sein de la molécule d'ADN conduisant le plus souvent à une mutation par addition (plus rarement délétion) d'une ou plusieurs paires de bases.

Exemples : Les colorants d'acridines tels que le Bromure d'éthydium

Agents physiques

Les ultra violets (UV) créent l'apparition de dimères de thymine en provoquant une liaison covalente entre deux thymines adjacentes. Les radiations ionisantes (X ou gamma) créent également des modifications de l'ADN par distorsion de la double hélice, des cassures, ou des pontages interbrins ou intrabrins (dimère de pyrimidines)

Agents biologiques

(Voir chapitre correspondant sur les éléments génétiques transposables)

Conséquences des mutations

Une mutation a des répercussions diverses sur le phénotype selon sa nature et sa localisation dans le génome, mais aussi selon les conditions du milieu dans lequel vit la cellule ou l'organisme concerné. C'est quand le gène muté est exprimé, au moment de la traduction, que l'effet sur la protéine codée par le gène se manifeste.

Quelles peuvent être les conséquences de ces mutations sur la fonction des protéines correspondantes ?

Mutations ponctuelles

La substitution d'une seule base conduit à la modification d'un codon. Compte tenu du code génétique, une mutation ponctuelle n'est pas nécessairement associée à une modification d'un acide aminé au niveau de la protéine. Trois cas de figure sont alors possibles (Fig. 1).

La mutation est muette ou silencieuse (fig. 1 A) : Du fait de la dégénérescence du code génétique, le changement de la séquence nucléotidique dû à la substitution d'un nucléotide, n'entraîne pas de changement de la séquence peptidique .

La mutation est dite faux-sens (Fig. 1 B) : Cette mutation entraîne l'incorporation d'un "mauvais" acide aminé dans la chaîne polypeptidique. Si cet acide aminé est important, on obtient un phénotype mutant. Il est néanmoins possible que cette modification soit sans effet sur la fonction de la protéine ; se comportant alors comme une mutation silencieuse.

La mutation est dite non-sens (Fig. 1 C) : C'est une mutation conduisant à l'apparition d'un codon non-sens (codon stop : UAA, UAG, UGA) responsable de l'arrêt de la traduction. Ainsi, la protéique sera tronquée ou absente (si le codon stop apparaît au début de la phase ouverte de lecture). Une

protéine tronquée et le plus souvent biologiquement inactive.
Les mutations par insertion ou délétion (Fig. 2) qui résultent de l'insertion ou la délétion d'une base ou d'un segment d'ADN sont exceptionnellement silencieuses car elles provoquent des déphasages du cadre de lecture et désorganisent totalement les régions touchées.

Le phénomène de réversion
Un mutant bactérien peut retrouver son phénotype sauvage grâce à un phénomène réversion. Néanmoins c'est un phénomène rare qui ne survient que lorsqu'il s'agit d'une mutation ponctuelle, ou de l'insertion de certains transposons capable de s'exciser spontanément.
Dans le cas d'une mutation ponctuelle le phénomène de réversion nécessite une nouvelle mutation dite suppressive. On parle alors de vraie réversion lorsque la séquence d'ADN redevient normale ou de pseudo-réversion lorsque le phénotype se normalise mais que le génotype reste modifié par rapport à la souche sauvage. Le phénomène de réversion ne peut pas survenir lorsque le mécanisme de la mutation résulte d'une délétion.

Principales caractéristiques des mutations*:*

Exemple de la résistance aux antibiotiques

"Spontanéité" des mutations
Si on considère une souche bactérienne sensible à la streptomycine, donc incapable de croître en présence de cet antibiotique à une concentration ≥ 1mg/l.
Si l'on étale un nombre suffisant de bactéries (10^8) sur une gélose contenant 100mg/l de streptomycine, une ou plusieurs colonies apparaissent, témoignant d'une acquisition spontanée de la propriété de résister à la streptomycine : ce sont des mutants résistants à la streptomycine.
Fait essentiel, ces mutants n'ont pas été créés par la streptomycine, mais sont apparus de façon "spontanée" (ici, le qualificatif spontané signifie simplement que la mutation n'a pas été induite par la streptomycine). En d'autres termes, ces mutants préexistaient parmi les 10^8 bactéries mises sur la gélose contenant la streptomycine, et ont seulement été sélectionnés par l'antibiotique.
Le phénotype "résistant à la streptomycine" est stable est se transmet aux générations de descendantes.

Rareté des mutations
La probabilité qu'une bactérie mutante, pour un caractère donné, apparaisse au cours d'une division bactérienne, est d'environ 10^{-6} à 10^{-8}. Mais, pour les mutants résistants aux antibiotiques, la fréquence des mutations varie en fonction de l'antibiotique considéré. Par exemple, alors que, habituellement la probabilité de mutation est de 10^{-6} à 10^{-8} mais, pour certains antibiotiques comme la rifampicine ou fosfomycine la probabilité de sélectionner des "mutants résistants" est plutôt de 10^{-4}-10^{-5} ; donc plus élevée.

La conséquence pratique en antibiothérapie est de ne jamais utiliser la rifampicine ou la fosfomycine autrement que dans le cadre d'une association de 2 antibiotiques (ou plus) afin de diminuer la probabilité de sélectionner des mutants résistants (exemple d'une association ß-lactamine+fosfomycine: les mutants résistants à la fosfomycine sont détruits par la ß- lactamine associée).

Spécificité et indépendance des mutations.

► **Spécificité**
Une mutation est habituellement spécifique d'un caractère donné. Un mutant résistant à la streptomycine ne résiste pas à l'amikacine (autre aminoside) et encore moins aux ß-lactamines (type pénicilline). Cependant, la mutation d'une porine provoque une imperméabilité aux antibiotiques qui empruntent cette porine (exemple : aminoside, ß-lactamines). On dit que la mutation a un effet pléïotrope.

► **Indépendance**
Un mutant résistant à la streptomycine peut devenir résistant, par une deuxième mutation

à un autre antibiotique (exemple : la rifampicine). Fait essentiel, cette deuxième mutation est indépendante de la première et s'effectue à un taux qui lui est propre.

Ces propriétés sont à la base de l'emploi de plusieurs antibiotiques simultanément (polychimiothérapie), quand le risque de résistance par mutation est grand.

Exemple du traitement de la tuberculose.
Le traitement d'une tuberculose nécessite initialement l'association de 3 anti-tuberculeux (Isoniazide INH, rifampicine et éthambutol).
La résistance à chacun de ces anti-tuberculeux apparaît à une fréquence d'environ 10^{-7} *Mycobacterium tuberculosis*. Une caverne comporte environ 10^{8} bactéries. Aussi il peut exister d'emblée une résistance primaire à l'INH. Il faut donc donner au moins deux antibiotiques actifs pour éviter la sélection de mutants résistants.
En pratique, il est habituellement associé un quatrième anti-tuberculeux, qui a la capacité d'atteindre les germes intracellulaires quiescents. Il s'agit de la pyrazinamide.

Correction des mésappariements suite à la réplication

Il existe de nombreux systèmes de réapparition des anomalies de l'ADN, que celles-ci soient survenus spontanément ou induites par un agent exogène. Ici nous ne verrons que les principaux systèmes de réparation suite à une erreur survenant au cours de la réplication. Bien que ces systèmes aient pour but de garantir à la cellule fille la transmission d'une information génétique identique à celle de la cellule mère, leur fiabilité reste imparfaite. Ainsi le taux de mutation observé reflète l'équilibre entre le nombre d'événements qui endommagent l'ADN et le nombre de ceux qui ont été corrigés, ou éventuellement mal corrigés.

Correction des erreurs de la réplication
D'après les données physico-chimiques sur la spécificité de l'appariement entre les bases nucléiques on estime que la fréquence d'incorporation d'un nucléotide erroné devrait être de l'ordre de 10^{-3} par nucléotide incorporé. Ce qui est nettement supérieur au taux observé de mutations (10^{-8} à 10^{-10}). L'amélioration de la spécificité de la complémentarité des bases se fait au cours de la réplication grâce aux ADN polymérases bactériennes qui possèdent une activité exonucléasique 3'→5' ; qui fonctionnent donc en sens inverse de la direction de la synthèse et qui permettent d'assurer la correction immédiate d'erreurs d'appariement au moment de la réplication. Cependant, certains mésappariements échappent à cette correction et des bases se trouvent parfois incorrectement insérées dans le brin d'ADN en formation. Ces imperfections ne conduisent pas nécessairement à des mutations car elles peuvent être corrigé par un système appelé système de réparation de mésappariement

Correction des mésappariements (Fig.3)
Le système de réparation des mésappariements identifie un mauvais appariement par l'action du produit des gènes *mutS* et *mutL*, il distingue les deux brins à leur degré de méthylation, l'endonucléase MutH incise alors le brin le moins méthylé à une certaine distance de part et d'autre de la base erronée, l'exonucléase 1, qui agit de 5' vers 3', excise alors les nucléotides de ce brin entre les deux incisions, le fragment manquant est synthétisé par complémentarité à la matrice sous l'action de l'ADN polymérase-I, et la continuité est rétablie par une ADN ligase. Bien sûr une hélicase (MutU) en l'occurrence, et des SSB (*single strand binding*) qui stabilisent le simple brin, interviennent dans ce processus.
Pour être correcteur, et non générateur d'erreurs, un tel système de réparation doit être capable de distinguer la base correcte, celle du brin parental, de la base incorrecte, celle de la molécule fille. Cette reconnaissance se fait grâce à l'enzyme Dam méthylase (Dam pour "*damage*") qui

reconnaît et méthyle (●) en position N6 des adénines (A) des séquences GATC. En effet, la méthylation des adénines de cette séquence GATC se fait après la réplication mais pas au niveau de la fourche de réplication. Ainsi le brin parental a été méthylé sur toute sa longueur au cours du cycle de réplication précèdent, alors que le brin néosynthétisé présente un gradient de méthylation, et surtout l'absence de méthylation à proximité de la fourche de réplication.

Conclusion

Au cours de la réplication, l'instabilité chimique et les lésions de l'ADN sont des évènements distincts, qui, malgré les mécanismes de correction et de réparation de l'ADN, maintiennent un certain taux de mutations qui introduisent donc une variabilité de l'information génétique. Ainsi la permanence d'un certain taux de mutations joue certainement un rôle important dans le maintien de la diversité biologique au cours de l'évolution.

Figure 1 : Mutations ponctuelles

Figure 1- Mutations ponctuelles

ATG AAA AAA ATA I ATG CTA I GTT I I I   Gène sauvage
M K K I M L V

(A)

ATG AAA AAA ATA I ATG CTT I GTT I I I
M K K I M L V

• *Mutation ponctuelle (Transversion)*
Séquence peptidique = idem
Mutation silencieuse

(B)

ATG ACA AAA ATA I ATG CTG I GTT I I I
M T K I M L V

• *Mutation ponctuelle (Transversion)*
Séquence peptidique différente
Phénotype : très variable et imprévisible
Mutation faux-sens

(C)

ATG AAA TAA ATA I ATG CTG I GTT I I I
M T — I M L V

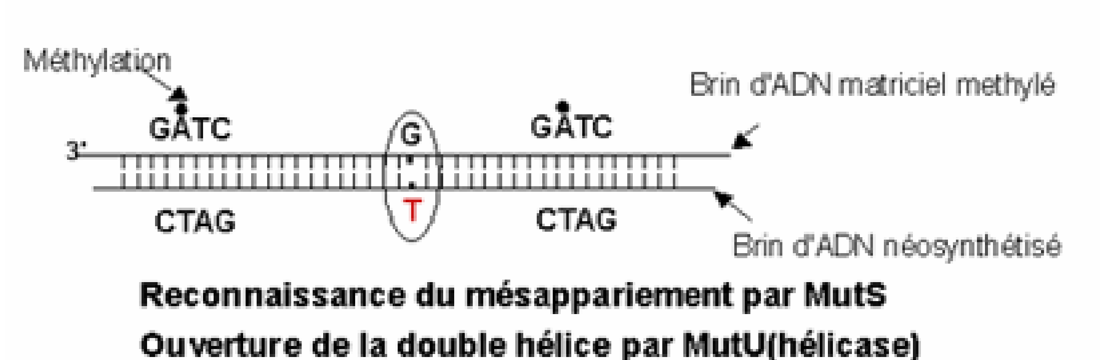
• *Mutation ponctuelle (Transversion)*
Protéine tronquée par l'apparition d'un codon stop
Phénotype : protéine absente ou tronquée
Mutation non-sens
codons stop : TAA (uaa)

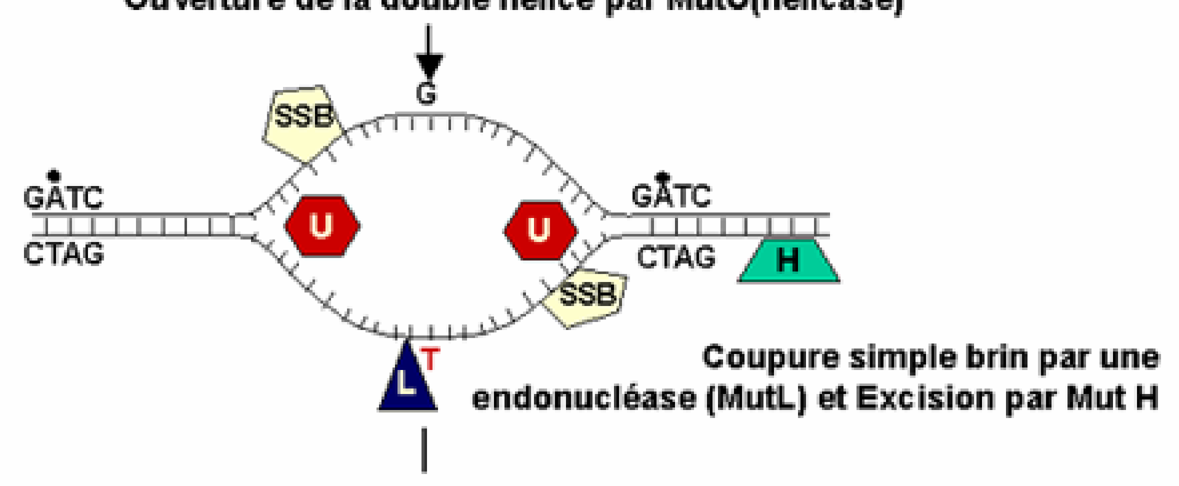
Figure 2 : Mutation par délétion



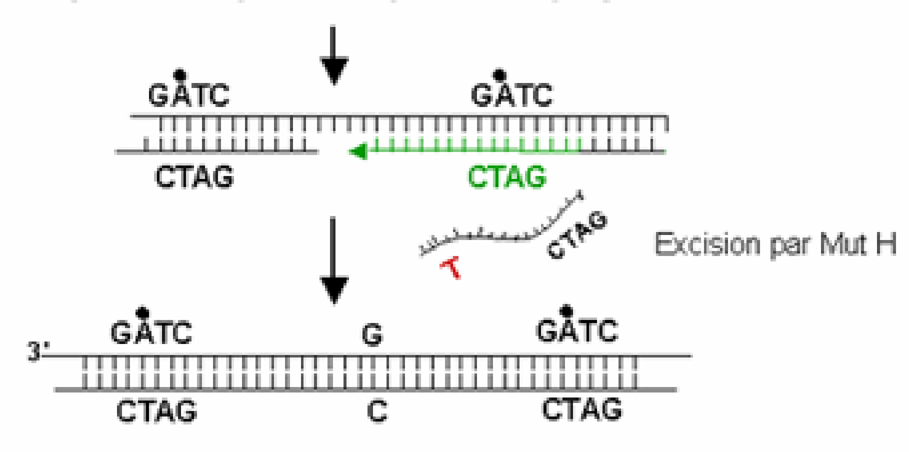
Figure 3 : Système de réparation des mésappariements

Figure 3- Système de réparation des mésappariements





Synthèse réparatrice par l'ADN polymérase I



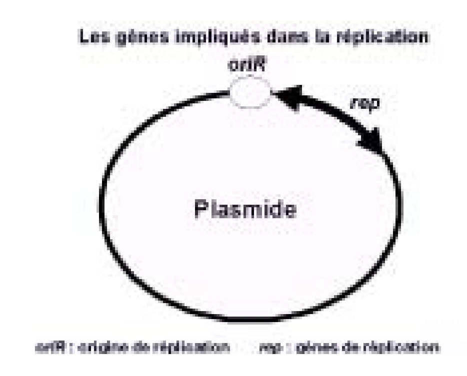
Molécule d'ADN réparée

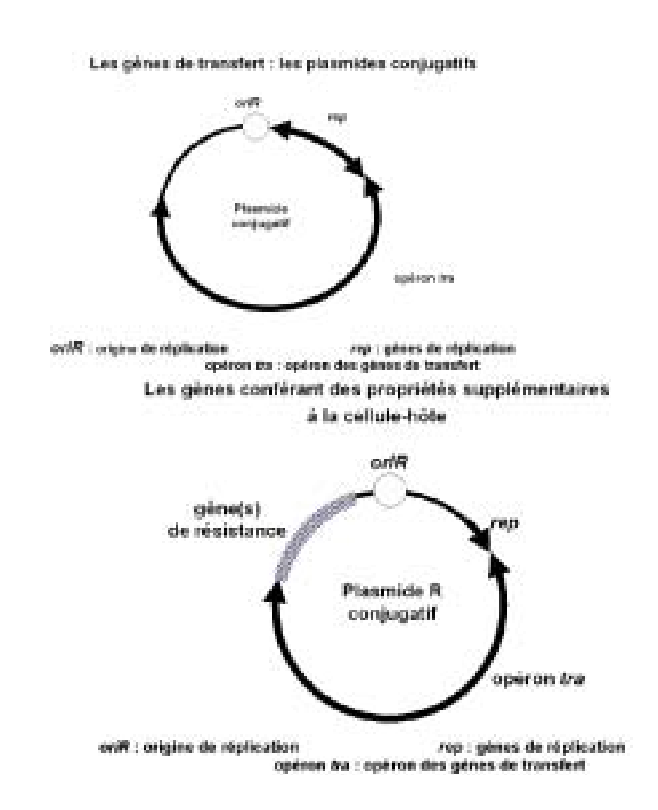
Eléments génétiques mobiles

Les plasmides

Caractéristiques générales
Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaire, à localisation extra-chromosomique, à réplication autonome. Ils sont transmis de façon stable au cours des divisions cellulaires et ne sont pas indispensables à la bactérie-hôte. Ils confèrent à la bactérie-hôte une grande souplesse génétique et augmentent son patrimoine génétique. Ils sont présents chez la plupart des espèces bactériennes et sont très différents les uns des autres, avec des tailles habituellement entre 3 à 400 kb.

Propriétés des plasmides
Les plasmides sont des associations modulaires de gènes regroupés en unités fonctionnelles.





- Les gènes impliqués dans la réplication
Un plasmide est un réplicon qui possède donc un système de réplication autonome, lui permettant de se maintenir à un taux constant dans les cellules au cours des divisions successives. Ce système de régulation est à l'origine du phénomène d'incompatibilité et du contrôle du nombre de copies plasmidiques dans la cellule bactérienne. Des plasmides incompatibles ne peuvent coexister dans la même cellule, car leur réplication est soumise au même système de régulation. Les plasmides sont ainsi classés en groupe d'incompatibilité ou groupe Inc. Des plasmides appartenant au même groupe d'incompatibilité présentent de fortes homologies ADN/ADN et sont fortement apparentés structuralement.

- Les gènes de transfert

► Plasmides conjugatifs
Un plasmide conjugatif est autotransférable d'une bactérie à une autre par conjugaison. Sa taille est supérieure à 30 kb chez *Escherichia coli* 90 kb , dont 30 à 50 kb pour les gènes nécessaires au transfert conjugatif. Ces plasmides sont en faible nombre de copies de 1 à 3 par cellule. L'ensemble des gènes nécessaires à la conjugaison chez le plasmide F est organisés en un opéron dit

tra. Cet opéron code pour les pili sexuels et pour les protéines nécessaires à la conjugaison.Les plasmides conjugatifs transfèrent entre des bactéries appartenant à la même espèce bactérienne (transfert intra spécifique) entre des bactéries appartenant à des espèces bactériennes différentes mais appartenant au même genre (transfert intra-générique) ou même entre des bactéries phylogénétiquement très éloignées appartenant à des genres différents (transfert inter générique). Ces transferts ont un rôle très important dans la dissémination de l'information génétique et particulièrement des gènes de résistance aux antibiotiques.

- **Plasmides non conjugatifs**

Les plasmides non conjugatifs ne sont pas autotransférables. Ils sont de taille plus petite de 1 à 70 kb, souvent cryptiques, et en grand nombre de copies (> 10), du fait d'un contrôle relâché de leur réplication. Ils peuvent être transférés à une autre bactérie par deux autres mécanismes de transfert : la transduction et mobilisation grâce à la présence d'un plasmide ''mobilisateur''.

- Les gènes conférant des propriétés supplémentaires à la cellule hôte

Les gènes de résistance aux antibiotiques

Les gènes de virulence peuvent être portés par des plasmides, des transposons ou des phages. Les gènes de virulence portés par des plasmides ont été étudiés surtout chez les entérobactéries (*Escherichia coli, Shigella, Yersinia, Salmonella*), mais également chez des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus, Bacillus anthracis*). Ce sont des plasmides de grande taille (> 200 kb).

Exemples : le plasmide de virulence de *Shigella* code pour les protéines permettant à la bactérie de se multiplier dans les cellules de la muqueuse digestive ; certaines hémolysines sont localisées sur des plasmides, de même que la toxine LT ou ST chez *E. coli* entérotoxinogène, ou encore des facteurs d'adhésion.

Les gènes métaboliques

Ce sont des gènes non indispensables à la vie de la bactérie qui peuvent être une cause d'erreur pour l'identification des souches. Ces gènes sont d'un grand intérêt sur le plan biotechnologique, car ils peuvent dégrader des produits chimiques.

Méthodes d'études des plasmides

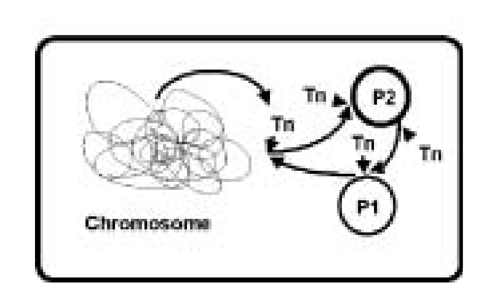
L'extraction et purification de l'ADN plasmidique se fait:

- par mini préparation par la méthode de la lyse alcaline, lyse des bactéries, dénaturation de l'ADN par action combinée de la soude et du SDS, renaturation de l'ADN plasmidique et précipitation de l'ADN chromosomique.
- par ultracentrifugation en chlorure de césium et bromure d'éthidium.L'analyse du contenu plasmidique se fait par électrophorèse en gel d'agarose, après digestion par des enzymes de restriction (profil de restriction), transfert selon la technique de Southern et hybridation avec des sondes spécifiques. La cure plasmidique est l'élimination du plasmide de la bactérie qui l'héberge. Elle peut être spontanée (événement rare) ou provoquée par un agent chimique avec des produits qui vont inhiber sélectivement la réplication plasmidique ou interférer avec la ségrégation de ces molécules (agents intercalants), ou encore provoquée par la chaleur. Le transfert de l'ADN plasmidique peut se faire par conjugaison à une bactérie réceptrice ou par transformation.

Les transposons

Les transposons sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon sur un autre (transposition intermoléculaire) ou sur le même réplicon (transposition intramoléculaire).

Transposition



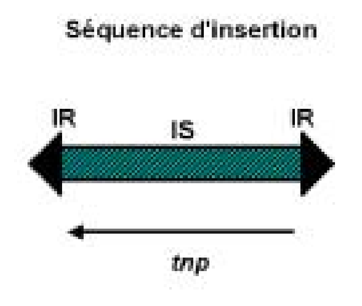
Caractéristiques générales de la transposition

C'est un événement rare (10^{-5} à 10^{-6}) survenant en l'absence d'homologie entre les ADN interagissant et indépendamment des fonctions de recombinaison de la bactérie-hôte (protéine RecA). Les transposons peuvent théoriquement s'intégrer n'importe où. Cependant certaines régions riches en AT, entraînant une certaine conformation de l'ADN-cible, constituent des points chauds d'insertion.

Classification

Il existe 3 types de transposons :

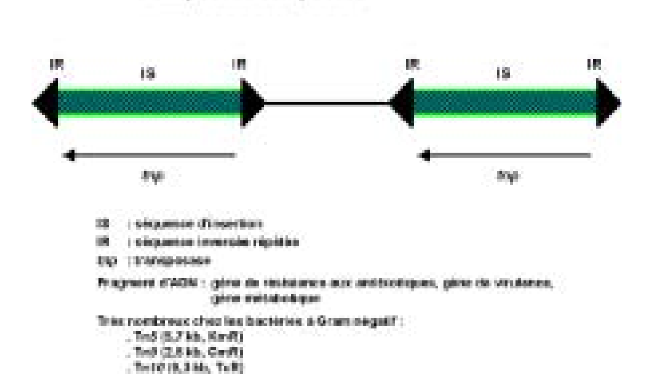
(1) Les séquences d'insertion (IS) : éléments transposables les plus simples, très répandus chez les bactéries à Gram négatif (entérobactéries). Plusieurs copies intégrées dans le chromosome ou dans un plasmide. Ils sont constitués de 2 IR (*inverted repeats*) encadrant un gène *tnp* codant pour une transposase.



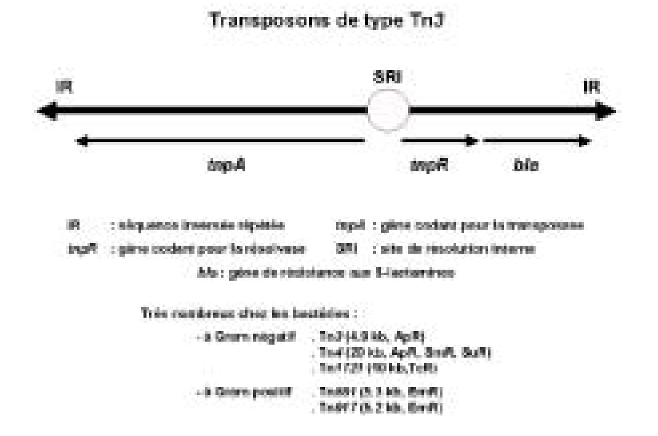
IS : séquence d'insertion
IR : séquence inversée répétée
tnp : transposase

Eléments transposables les plus simples, très répandus chez les bactéries à Gram négatif (entérobactéries). Plusieurs copies intégrées dans le chromosome ou dans un plasmide.

(2) Les transposons composites : éléments constitués de plusieurs séquences IS éventuellement associés à des fragments d'ADN codant pour des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes de virulence ou des gènes métaboliques. Ces transposons sont très nombreux chez les bactéries à Gram négatif : Tn*5* (5,7 kb, KmR), Tn*9* (2,6 kb, CmR), Tn*10* (9,3 kb, TcR)



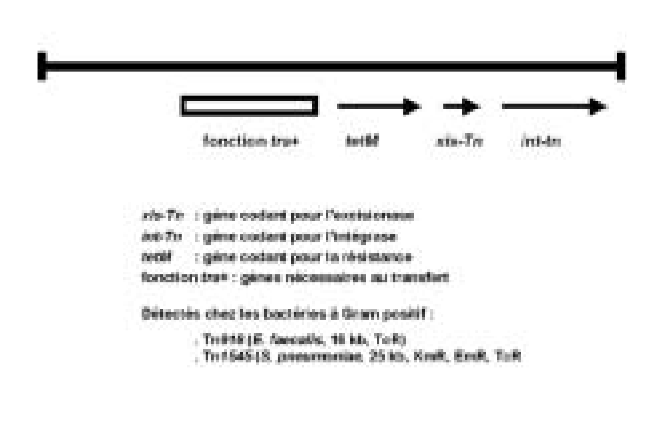
(3) Les transposons de la famille Tn*3* : ces éléments sont constitués de 2 séquences IR encadrant un gène *tnpA*: gène codant pour la transposase, un gène codant pour la résolvase *tnpR*, un site de résolution interne (SRI) et un gène *bla* de résistance aux ß-lactamines. Ils sont très nombreux chez les bactéries à Gram - : Tn*3* (4.9 kb, ApR), Tn*4* (20 kb, ApR, SmR, SuR), Tn*1721* (10 kb, TcR) ; et chez les bactéries à Gram + : Tn*551* (5.3 kb, EmR), Tn*917* (5.2 kb, EmR), Tn*1546* (12 kb, VanA).



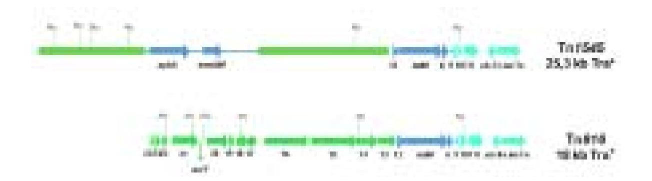
(4) Les transposons conjugatifs : ces éléments codent pour le gène *xis-Tn* codant pour l'excisionase, le gène *int-Tn* codant pour l'intégrase, le gène *tetM* codant pour la résistance à la tétracycline, les gènes codant pour les fonctions *tra*+ nécessaires au transfert conjugatif. Ces transposons sont détectés chez les bactéries à Gram positif, les prototypes de ces éléments sont les transposons Tn*916* (*E. faecalis*, 16 kb, TcR), et Tn*1545* (*S. pneumoniae*, 25 kb, KmR, EmR, TcR). Le spectre d'hôte des transposons conjugatifs est large, permettant des transferts vers la quasi-totalité des bactéries à Gram+ (Staphylococcus,

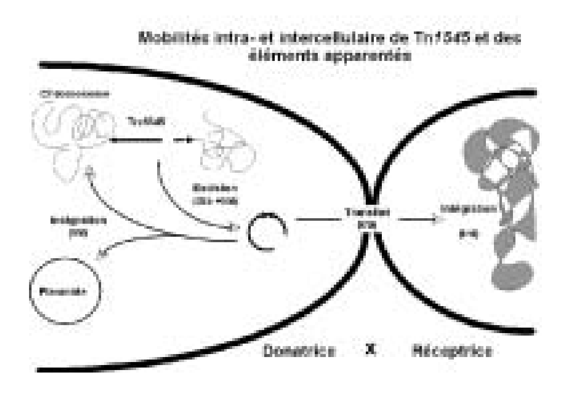
Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Clostridium) mais également vers des bactéries à Gram – (Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens …).

Transposons conjugatifs

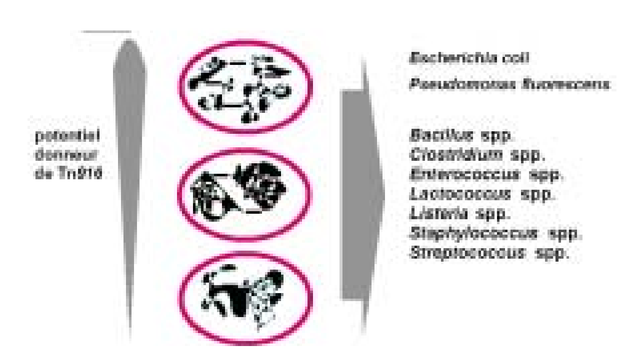


Tn1545 et transposons apparentés





Spectre d'hôte des transposons conjugatifs



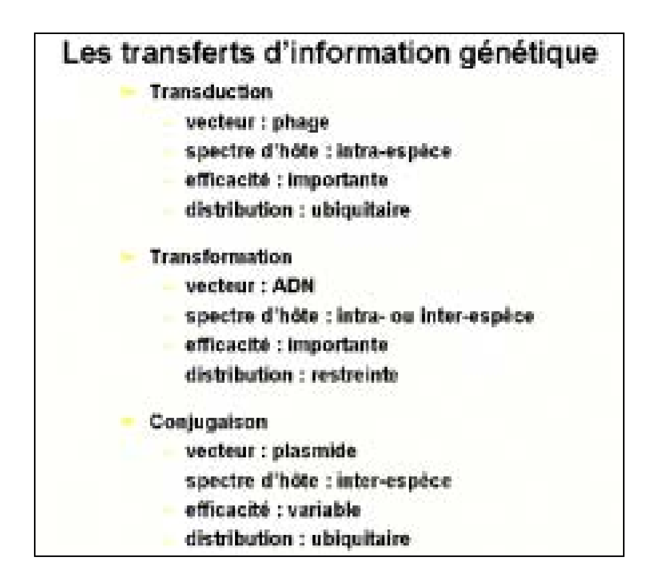
Enfin, les intégrons sont des structures qui permettent une construction modulaire des plasmides de résistance : ils sont constitués d'un gène codant pour une intégrase *intI1* jouxtant un site *attI* d'attachement où peuvent s'insérer les gènes de résistance sous forme de cassette.

.

Transfert de l'information génétique

Transfert de l'information génétique chez les bactéries

Le patrimoine génétique des bactéries est plastique et varie au cours du temps. A côté des mutations spontanées, qui permettent aux bactéries de s'adapter sous la pression de sélection de leur environnement, il existe des mécanismes d'adaptation beaucoup plus efficaces fondés sur l'acquisition de matériel étranger: ce sont les transferts génétiques. Les principaux transferts génétiques utilisent soit des fragments d'ADN libres, soit des éléments génétiques spécialisés (plasmides, transposons) et les bactériophages. Ces vecteurs naturels d'information génétiques ont été modifiés et sont des outils précieux utilisés en biologie moléculaire.Il existe 3 principaux types de transferts : transformation, conjugaison, transduction.

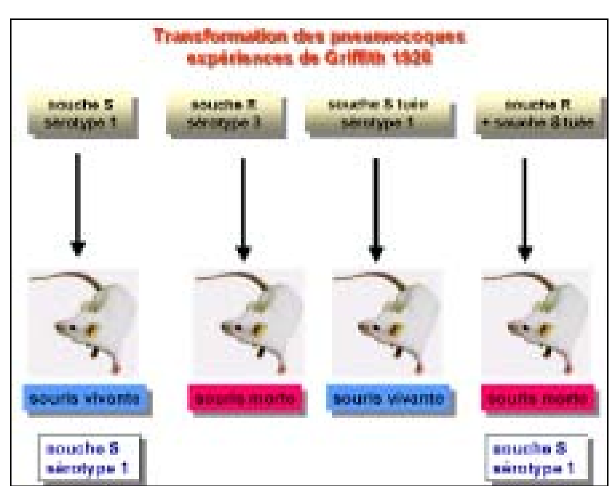


Les transferts d'information génétique

- Transduction
  - vecteur : phage
  - spectre d'hôte : intra-espèce
  - efficacité : importante
  - distribution : ubiquitaire
- Transformation
  - vecteur : ADN
  - spectre d'hôte : intra- ou inter-espèce
  - efficacité : importante
  - distribution : restreinte
- Conjugaison
  - vecteur : plasmide
  - spectre d'hôte : inter-espèce
  - efficacité : variable
  - distribution : ubiquitaire

Transformation

Découvertes. Le phénomène de trans-formation a été découvert en 1928 par Griffith chez les pneumocoques. Les pneumocoques possèdent une capsule polyosidique, dont les propriétés antigéniques varient selon les souches : il existe une centaine de sérotypes capsulaires (sérotypes 1,2,3…).Les souches capsulées donnent des colonies lisses, ou S ("*smooth*") et sont virulentes très virulentes chez la souris. Les pneumocoques peuvent perdre spontanément in vitro leur capsule et leurs colonies prennent un aspect R ou rugueux et deviennent avirulentes. Griffith montre que des bactéries R vivantes mélangées avec des bactéries S tuées par la chaleur tuent la souris et redonnent des colonies S. Les souris servent en quelque sorte à sélectionner les rares transformants S très virulents. En 1944, Avery, McCarthy et MacLeod démontrent que le principe transformant impliqué dans cette transformation est de l'ADN: c'est l'ADN des pneumocoques capsulés de sérotype 1 qui fournit l'information génétique aux pneumocoques vivants non capsulés obtenu à partir d'une souche de sérotype 3.



Définition de la transformation. La transformation est l'acquisition de matériel génétique par certaines espèces bactériennes, par pénétration de molécules de ADN nu (*naked* DNA) présentes dans le milieu extérieur.

La transformation naturelle.

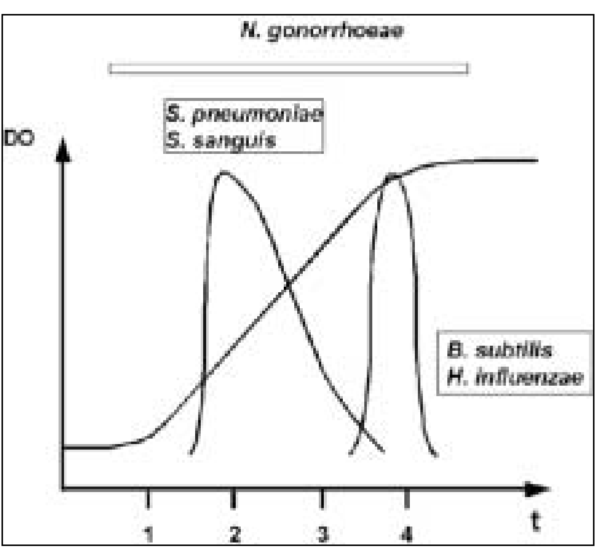
Seules certaines espèces bactériennes sont aptes à acquérir naturellement de l'ADN exogène: pneumocoques et certains streptocoques, *Neisseria, Bacillus subtilis* et *Haemophilus influenzae*.

isolats cliniques des espèces pathogènes naturellement transformable

Espèces bactériennes	fréquence des transformants
Campylobacter jejuni	2.0×10^{-4}
Campylobacter coli	1.2×10^{-3}
Haemophilus influenzae	7.0×10^{-3}
Haemophilus parainfluenzae	8.6×10^{-3}
Helicobacter pylori	5.0×10^{-4}
Moraxella spp.	5.0×10^{-4}
Neisseria gonorrhoeae	1.0×10^{-4}
Neisseria meningitidis	1.1×10^{-3}
Staphylococcus aureus	5.5×10^{-4}
Streptococcus pneumoniae	2.9×10^{-3}
Streptococcus sanguis	2.0×10^{-3}
Streptococcus mutans	7.0×10^{-4}

Pour être transformable, les bactéries doivent être en état de compétence, processus dont les mécanismes sont différents selon les espèces. La transformation naturelle est un mode de transfert génétique essentiel chez le pneumocoque (gènes codant pour les PBPs conférant la résistance aux ß-lactamines) et les *Neisseria* (notamment variation de la piline permettant l'échappement au système immunitaire).

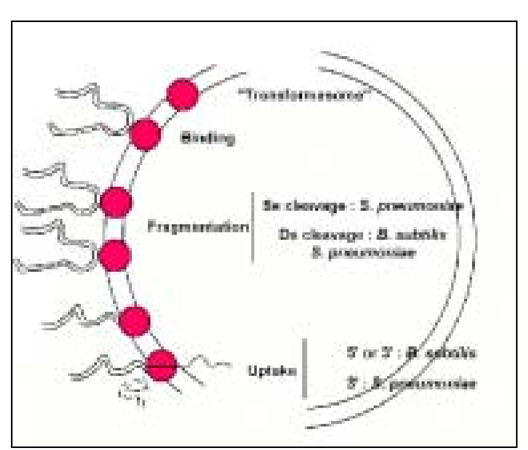
Les principales étapes de la transformation ont surtout été étudiées chez les bactéries à gram positif, notamment *Bacillus subtilis* qui est le modèle le plus étudié.



Etat de compétence en fonction de la croissance des bactéries (continue pour le gonocoque, précoce pour les Streptocoques, et plus tardif pour *Bacillus* et *Haemophilus*).

Pour être transformant, l'ADN doit être bicaténaire et d'un poids moléculaire suffisant (> 5-10 MDa). L'origine de l'ADN n'a aucune importance : il peut provenir ou non de la même espèce bactérienne ou même d'un eucaryote et être de nature chromosomique, plasmidique ou phagique.

Les différentes étapes de la transformation sont la fixation de l'ADN à la bactérie en état de compétence, puis la fragmentation de l'ADN par des nucléases produisant des molécules bicaténaire de taille convenable (5 à 20 MDa), enfin l'entrée de l'ADN en quelques minutes, processus s'accompagnant d'une dégradation de l'ADN bicaténaire en ADN mono-caténaire. Ainsi, l'ADN simple-brin est internalisé mais ne peut subsister de façon autonome (incapacité à se répliquer). Il doit pour se maintenir s'intégrer au chromosome bactérien par recombinaison homologue avec échange avec un gène homologue du receveur. Pour que ce remplacement allélique ait lieu, il faut de larges homologies entre l'ADN exogène et endogène. En pratique, l'ADN provient de la même espèce bactérienne ou d'une espèce bactérienne proche.

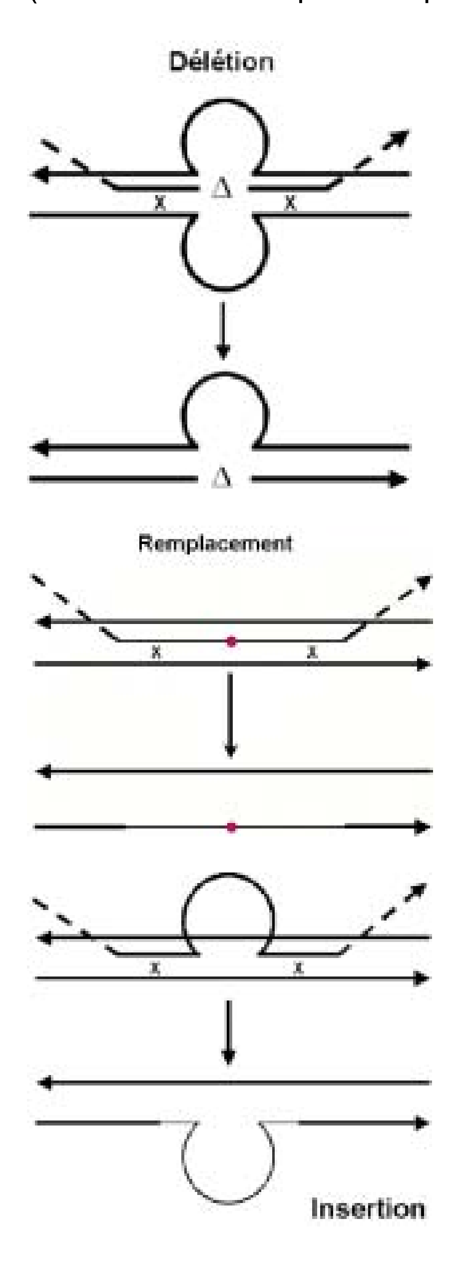


Le processus de transformation

Conséquences de la transformation

Le résultat de la transformation est le transfert durable de matériel génétique entraînant : (1) des mutations inactivant certains gènes par insertion [création de gènes mosaïques contenant des fragments de gènes introduits dans les gènes du receveurs, par exemple le gènes des PBPs de *S pneumoniae* et *N gonorrhoeae*], ou par délétion ; (2) un apport de nouveaux gènes

par remplacement(capsule de pneumocoques…) ou une variation antigénique chez le gonocoque (recombinaisons à partir de pseudogènes…).



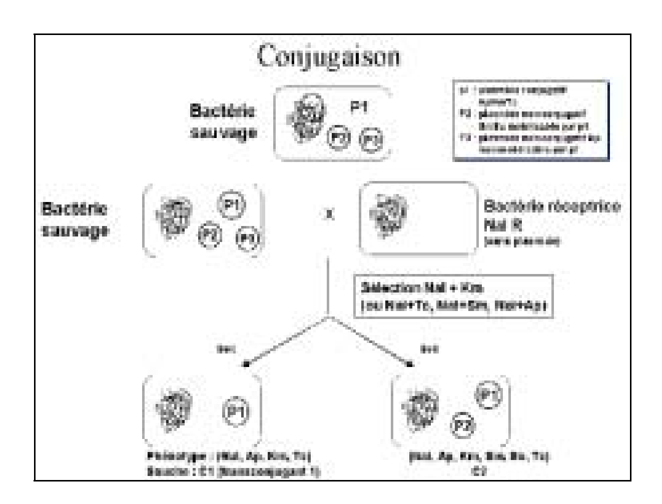
Transformation artificielle.
La transformation est utilisée pour manipuler génétiquement les bactéries par introduction d'ADN dans *E.coli*, par exemple. La transformation artificielle est différente de la transformation naturelle. On utilise souvent des espèces bactériennes qui ne sont pas naturellement transformables (*E.coli*). On peut introduire de l'ADN bicaténaire intact, notamment des plasmides entiers dont l'ADN peut se répliquer et s'exprimer de façon stable dans les bactéries réceptrices (intérêt pour les manipulations génétiques). Différentes techniques sont utilisées, reposant sur une désorganisation de la paroi qui permet le passage de l'ADN : choc thermique (changement brutal de température de 0°C à >42°C), choc électrique (électroporation).

Conjugaison

Définition. La conjugaison est un processus de transfert unidirectionnel d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, par un mécanisme requérant un contact spécifique. Le matériel génétique peut être transmis d'une bactérie à l'autre sans apparaître dans le milieu extérieur (transfert possible même en présence de DNAse dans le milieu).

Plasmides et transposons. Il existe deux classes de véhicules du matériel génétique : les plasmides et les trans-posons.

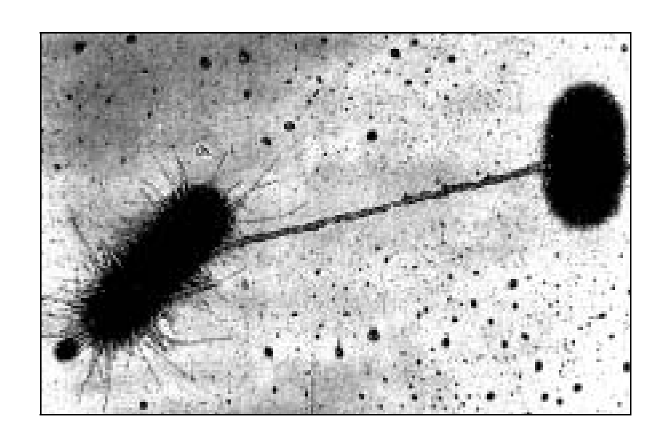
(1) Les plasmides sont des éléments génétiques capables de autoréplication et exprimant des fonctions de transfert (plasmides autotransférables). Certains plasmides dits "mobilisables" sont capables de transfert conjugatif dans la bactérie donatrice : dépourvus de gènes *tra* mais ils possèdent la séquence *ori*T, et utilisent d'autres plasmides qui leur permettent de transférer leur matériel génétique.



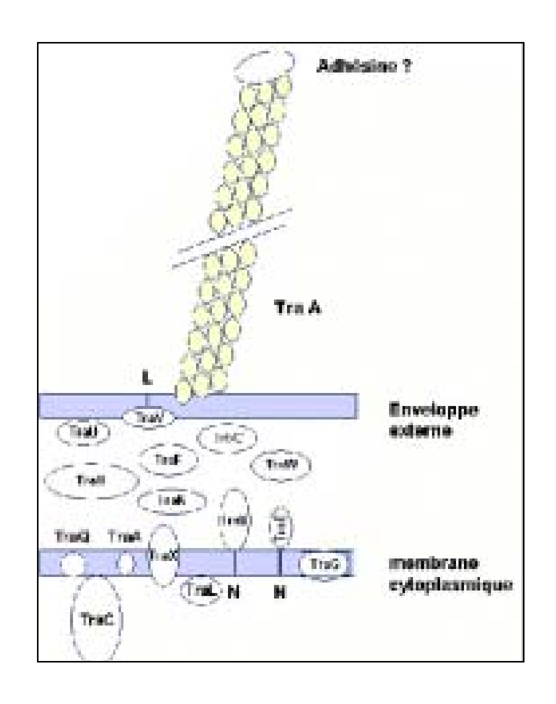
(2) Les transposons s'intègrent sur le chromosome ou sur des plasmides pour se répliquer et n'expriment que des fonctions de transfert. On observe souvent une synergie entre ces véhicules, en particulier des transposons portés par des plasmides.

Fonctions de transfert. De façon générale, le transfert et l'expression des fonctions de transfert sont très finement régulées, vraisemblablement pour limiter la charge biosynthétique liée à ce processus. Les gènes responsables de cet transfert sont relativement nombreux (>30 pour le plasmide F de *E. coli*). Les plasmides conjugatifs sont plus grands que les plasmides non conjugatifs (en général > 40 kb contre 5 kb). La conjugaison a été décrite chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positifs. Selon les espèces bactériennes, il existe de nombreux mécanismes moléculaires différents permettant ce transfert horizontal de matériel génétique.

Le transfert du plasmide F. Le plasmide F est un ADN circulaire bicaténaire qui se réplique chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*. Les principales étapes de la conjugaison peuvent être ainsi résumées en prenant comme exemple le modèle du plasmide F de *E coli.* Le transfert du plasmide F requiert : (1) la région *tra* (environ 33 kb) code pour une trentaine de gènes impliqués dans la machinerie du processus de conjugaison ; (2) la séquence *oriT* est une courte séquence spécifique appelée origine de transfert : c'est à ce niveau qu'un brin d'ADN est coupé avant d'être transféré. La bactérie donatrice conserve une copie du plasmide transféré. Il est habituellement extrachromosomique dans des bactéries mâles dites F+, parfois en situation intrachromosomique dans des bactéries dites Hfr. Les bactéries F+ transfèrent seulement le facteur F sansq autre matériel chromosomique, toutes les bactéries réceptrices devenant F+. Les bactéries Hfr transfèrent le l'ADN chromosomique séquentiellement , le facteur F étant transféré en dernier.

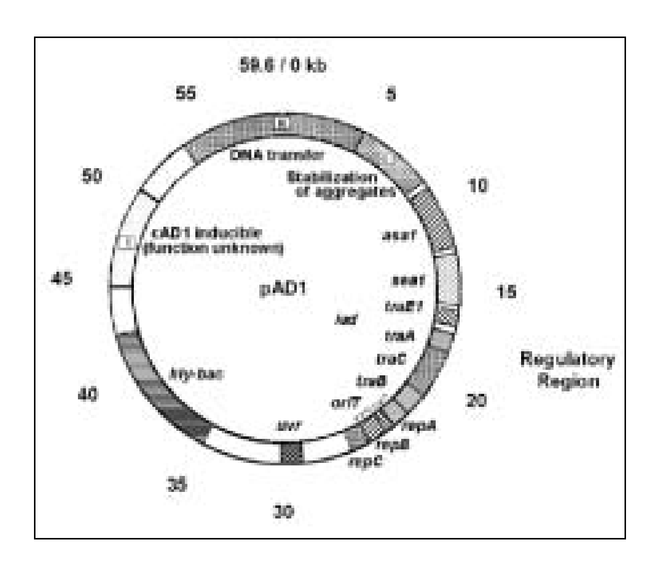


Le transfert spécifique d'un brin du plasmide se fait par une coupure à la séquence *oriT*. Le brin est alors transféré selon une polarité 5' vers 3' au travers du pore conjugatif formé par juxtaposition des membranes des bactéries donatrice et réceptrice. L'extrémité 5' du brin transféré reste attachée à la membrane cellulaire. L'ADN hélicase I est liée à la membrane à proximité du pore conjugatif et sa migration le long du brin transféré fournit la force nécessaire à l'entrée de l'ADN dans la réceptrice. Les brins complémentaires sont synthétisés dans la donatrice et la réceptrice par l'ADN polymérase III, respectivement de façon continue et discontinue.

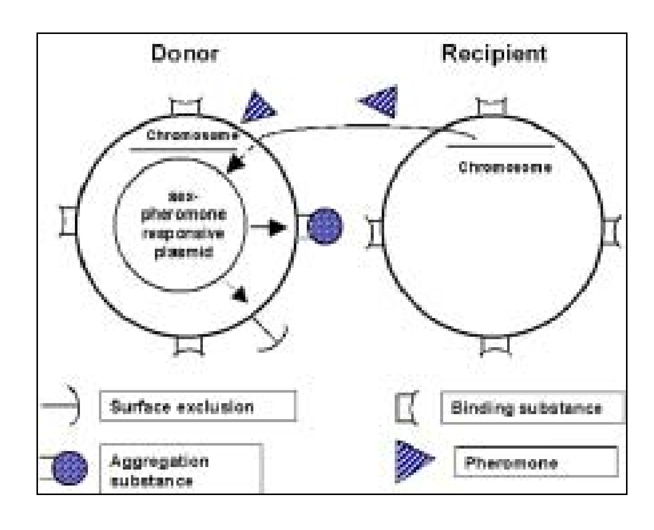


Les plasmides conjugatifs

Ce sont :
(1) les plasmides IncP (RP4, RK2, etc) des bacilles et coques Gram-négatif (Tra+, Rep+), des bacilles et coques Gram-positif bas GC% (Tra+, Rep-), et de Sacharomyces cerevisiae (Tra+, Rep-).



(2) le plasmide IncQ (RSF1010) des bacilles et coques Gram-négatif (Mob^{+}, Rep^{-+}) et des bacilles Gram-positif bas GC% (Mob^{+}, Rep^{+}).
(3) le plasmide Ti des plantes (Tra^{+}, Int^{+})
(4) les plasmides répondeurs aux sex-phéromones : ces plasmides (taille > 50 kb) décrits chez *Enterococcus faecalis* sont conjugatifs transférés en milieu liquide à très haute fréquence ($10^{-2/3}$). Le mélange de conjugaison (donatrice + réceptrice) entraîne la formation d'agrégats cellulaires (*clumps*). Ces agrégats sont le résultat d'interactions physiques dus à deux substances présentes à la surface des bactéries. La synthèse de l'une de ces substances, la substance agrégative, est codée par un déterminant plasmidique et induite par une sex-pheromone spécifique. De nombreux plasmides sex-pheromones dépendants ont été décrits, le plus connu d'entre eux est le plasmide pAD1 qui a 4 propriétés distinctes : une fonction de réplication ; une activité cytolytique ; une résistance aux UV ; un système conjugatif particulier ; des gènes de résistance aux antibiotiques.



Les transposons conjugatifs

Ce sont :
(1) le transposon Em-Tc DOT̃ à spectre d'hôte étroit (*Bacteroides fragilis̃*) conférant la résistance à la tétracycline (*tetQ*). Le transfert est induit par la tétracycline (X 10^{4}).

(2) le transposon Tn*916* à large spectre d'hôte retrouvé chez les bacilles et coques Gram positif, *E. coli* P. fluorescens. Ce transposon confère la résistance à la tétracycline (*tetM*)
et son transfert est induit par la tétracycline, *in vitro* et *in vivo* (X 10^{2}). Il existe de variants contenant des marqueurs additionnels de résistance (*ermB*, *aphA-3*)

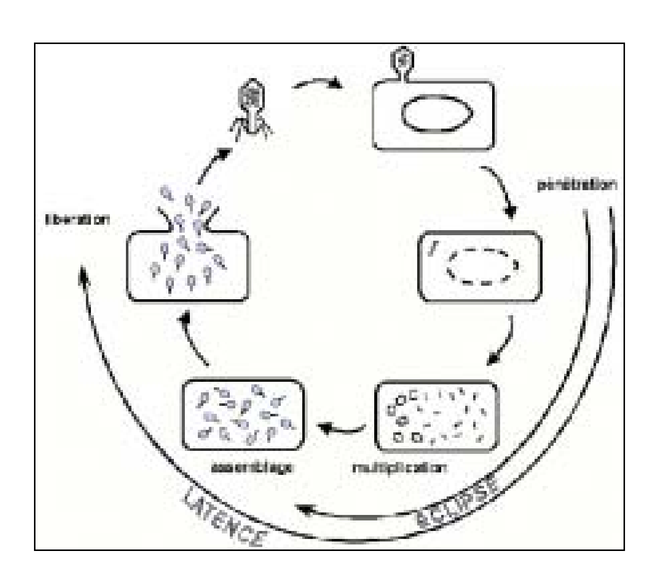
Conséquences de la conjugaison

Les conséquences de la conjugaison sont la dissémination horizontale de l'information génétique qui s'apparente à un processus infectieux. Le transfert est très efficace entre bactéries de la même espèce, mais peut aussi survenir avec une efficacité moindre entre bactéries d'espèces différentes, voire de genre différents permettant la dissémination de plasmides au sein de différentes espèces de la flore fécale, par exemple.

Transduction

La transduction est un transfert d'ADN bactérien entre bactéries par l'intermédiaire

des virus, les bactériophages (ou phages) dits "transducteurs". Ce transfert n'est en général possible qu'entre bactéries de la même espèce. Cependant, c'est un processus extrêmement efficace du fait de la protection du DNA dans les particules virales et d'un système de délivrance très performant par les phages. Ceux-ci sont très abondants dans l'environnement : par exemple en milieu aquatique, on trouve entre 10^3 et 10^8 phages / mL. Avec une exposition à 10^8 phages / mL, jusqu'à un tiers de la population bactérienne est sujette à une attaque virale en 24 h.



Il existe deux types principaux de transduction :
(1) La transduction généralisée est assurée par des phages virulents, c'est à dire par des phages qui, pour survivre, se multiplient dans les bactéries, entraînant ou non la mort bactérienne.
(2) La transduction restreinte ou spécialisée : assurée par des phages tempérés, comme le phage λ, c'est à dire par des phages à la fois virulents dans certaines conditions (cycle lytique) et capables de s'intégrer dans le chromosome de la bactérie hôte sous forme de prophage dans d 'autres conditions.

► **Transduction généralisée**
Au cours du cycle infectieux d'un phage virulent, les particules virales se forme dans les bactéries en encapsidant l'ADN viral. Le processus de transduction est lié au fait que cette encapsidation n'est pas spécifique du DNA viral mais peut concerner n'importe quel fragment du génome bactérien de taille convenable. Ainsi, lors de la production des phages, avec une faible fréquence (<1%), des fragments d'ADN bactérien peuvent être encapsidés par erreur dans des phages, formant des particules transductrices qui conservent les propriétés "infectieuses" des particules virales normale.
Les phages transducteurs sont des virus à ADN (T4 et P1 chez *E. coli* P22 et *Salmonella typhimurium*) qui restent capables de se fixer sur les bactéries et d'injecter leurs fragments d'ADN dans les bactéries réceptrices. L'ADN ainsi introduit correspond à n'importe quelle région génomique de la bactérie donatrice : c'est une tranduction généralisée. La transduction généralisée implique une expression stable des marqueurs transférés. L'ADN introduit peut s'intégrer dans une région homologue du chromosome par recombinaison homologue, comme dans la transformation naturelle. Si l'ADN injecté ne subit pas de recombinaison, les marqueurs transférés s'expriment transitoirement jusqu'à ce que l'ADN soit dilué aux cours des divisions bactériennes successives : c'est la transduction abortive.

► **Transduction spécialisée ou restreinte**.
Ce type de transduction consiste en un transfert limité à certains marqueurs, qui sont toujours les mêmes pour un phage donné. Le meilleur exemple est le phage λ qui ne transfère que les gènes nécessaires à la fragmentation du galactose (région *gal*) ou la synthèse de la biotine (région *bio*). Le phage λ s'intègre toujours sous forme de prophage entre les régions *gal* et bio du chromosome de *E.coli*. Lorsque le cycle lytique du phage λ se déclenche, l'ADN libéré est formé d'ADN viral et des régions *gal* ou *bio* (selon que l'excision se décale d'un côté ou de l'autre). La transduction assuré par le phage λ est donc restreinte aux marqueurs *gal* et *bio*.

Importance de la transduction
On connaît mal l'importance réelle du phénomène de transduction dans l'acquisition de nouvelles fonctions par les

bactéries pathogènes. Toutefois, un certain nombre d'ilots de pathogénicité des bactéries sont hébergés par des prophages intégrés dans les chromosomes bactériens (*V. cholerae* TCP et CTX, *E. coli* EPEC et EHEC, toxine diphtérique, toxines érythrogènes de *S pyogenes*…).

Les systèmes de capture de gènes

La limite de l'intégration après la transformation, c'est la divergence entre les séquences qui empêche la recombinaison. Les bactéries possèdent d'autres systèmes pour contourner cette difficulté qui prévient le transfert de matériel génétique. Ce sont les systèmes de capture de gènes.

Il peur s'agir de :

(1) de transposons composites avec des gènes flanqués d'un IS de chaque côté qui peuvent ainsi devenir mobiles et s'intégrer en utilisant la machinerie de l'IS (quelques transposons multi-résistants et métaboliques).intégrons qui sont des systèmes de capture qui transforment un fragment d'ADN en cassette par ajout d'une structure de reconnaissance pour un système de recombinaison spécifique de site (multi-résistance, virulence, fonctions adaptatives variées).

.

Evolution, dissémination et origine de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Evolution, dissémination et origine de la résistance bactérienne aux antibiotiques

On a initialement appelé antibiotique toute substance chimique produite par un micro-organisme, champignon (*Penicillium*, *Cephalosporium*) ou bactérie (*Bacillus* et surtout *Streptomyces*), pouvant inhiber la croissance (activité bactériostatique) ou détruire d'autres micro-organismes (activité bactéricide). Cette définition est maintenant abandonnée car de nombreuses molécules obtenues par synthèse ou par modification chimique d'une molécule naturelle (hémisynthèse) peuvent posséder ces propriétés. Un antibiotique est donc actuellement défini comme une substance, d'origine biologique ou synthétique, interagissant avec les bactéries (agents antibactériens) ou les champignons (agents antifongiques) par l'intermédiaire de cibles qui sont spécifiques soit d'un antibiotique, soit d'une famille d'antibiotique. L'interaction de l'antibiotique avec sa cible a pour effet de perturber la formation ou la structure des enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) ou encore d'inhiber certains processus métaboliques (synthèse des acides nucléiques, synthèse des protéines). Le mode d'action des antibiotiques est donc différent de celui des antiseptiques qui agissent globalement sur les différentes structures cellulaires par un effet physico-chimique non spécifique. Les agents antibactériens, antibiotiques qui seront seuls envisagés ici, peuvent être classés selon leur structure chimique ou leur mode d'action sur les bactéries. La liste des principaux agents antibactériens utilisés en médecine humaine et leur cible moléculaire spécifique sont indiqués dans le tableau 1.

I. La résistance bactérienne aux antibiotiques.

La découverte des sulfamides, puis de la pénicilline au lendemain de la seconde guerre mondiale, avait suscité le grand espoir des maladies infectieuses à jamais jugulées. Malheureusement, l'introduction de ces antibiotiques en médecine humaine fut rapidement suivie par l'apparition de bactéries pathogènes résistantes. L'introduction ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines et érythromycine, par ordre chronologique d'utilisation) fut suivie d'une évolution comparable. En fait, si l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis la diminution de la mortalité due aux maladies infectieuses, il n'en a nullement modifié la morbidité (fréquence de survenue). Cet usage, fréquemment abusif, est également responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec pour conséquence une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques. Cette évolution s'est traduite par une extension progressive de la résistance à la quasi-totalité des genres bactériens pathogènes pour l'homme ainsi que par l'émergence de caractères de résistance nouveaux. La connaissance des mécanismes biochimiques et du support génétique de la résistance permet, sur le plan médical, de guider les choix thérapeutiques et la politique antibiotique. Pour l'industrie pharmaceutique, l'élucidation des mécanismes de résistance aux antibiotiques permet, dans certains cas, la synthèse de nouvelles molécules réfractaires à ce type de résistance.

La sensibilité ou la résistance d'une bactérie aux antibiotiques est généralement évaluée au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme. Cette technique permet d'apprécier l'activité bactériostatique et de déterminer la concentration minimale inhibitrice d'un ou de plusieurs antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie. La résistance bactérienne aux antibiotiques a deux définitions: 1- une souche est dite "résistante" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le

développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Rapport Technique n° 210 de l'Organisation Mondiale pour la Santé, 1961); 2- une souche est dite "résistante" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre *in vivo.* L'antibiogramme réalisé avec plusieurs antibiotiques permet de déterminer très rapidement le phénotype de résistance de la souche (Fig. 1). Seules des études biochimiques et génétiques, non réalisées en pratique courante dans les laboratoires de microbiologie médicale, permettent d'élucider les mécanismes de la résistance aux antibiotiques.

I.1. Résistance naturelle.

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien. Elle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique qui est une conséquence des différences existant entre les structures pariétales bactériennes (Fig. 2), à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique, ou encore à l'absence de la cible. On peut citer, à titre d'exemple, les résistances naturelles des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides, des bactéries à Gram négatif à la vancomycine, des bactéries à Gram positif à la colimycine et à l'acide nalixique, des streptocoques aux aminosides, et des mycoplasmes aux ß-lactamines.

I.2. Résistance acquise.

La résistance bactérienne acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible. Elle est due à l'emploi en thérapeutique des antibiotiques et résulte soit d'une mutation affectant un gène régulateur ou un gène de structure, soit de l'acquisition d'un (ou de plusieurs) gène(s) qui rende(nt) la bactérie insensible à l'antibiotique.

La résistance consécutive à une mutation est la conséquence d'un changement des structures cellulaires existantes qui rend la cellule imperméable à un ou plusieurs antibiotiques ou encore rend les cibles pariétales (protéines liant la pénicilline, par exemple) ou intracellulaires (ARN polymérase, ADN gyrase, ribosomes,...) indifférentes à la présence du ou des antibiotiques. Ce type de résistance, qui ne concerne qu'un faible pourcentage (10 à 20%) des souches pathogènes isolées en clinique, est observé surtout après l'emploi de certains antibiotiques comme la streptomycine, la rifampicine, l'acide fusidique, la fosfomycine et les quinolones. Les mutations chromosomiques apparaissent spontanément avec des fréquences de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} selon les bactéries et les caractères considérés. L'antibiotique n'est pas directement mutagène, mais il sélectionne les rares mutants résistants au sein de la population bactérienne sensible. Ces mutations sont stables (les fréquences de réversion sont équivalentes à celle des mutations) et héréditaires, mais non transmissibles en dehors de la descendance. On a longtemps pensé qu'une mutation chromosomique ne pouvait être responsable de la résistance qu'à un ou plusieurs antibiotiques appartenant à la même famille. La probabilité d'obtenir en une étape des bactéries résistantes à deux antibiotiques (double mutant) est égale au produit des probabilités d'apparition de chacune des mutations considérées indépendamment. L'utilisation des associations d'antibiotiques en bi- ou tri-antibiothérapie semblait pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. En fait, des germes multirésistants aux antibiotiques (ß-lactamines, chloramphénicol, triméthoprime, tétracyclines) par mutation chromosomique sont actuellement isolés assez fréquemment en milieu hospitalier, en particulier chez certaines entérobactéries comme *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*.

Ces mutations affectent la structure de protéines dénommées porines qui permettent le passage transpariétal des antibiotiques. Elles entraînent une imperméabilité de la cellule bactérienne avec, pour conséquence, une co-résistance aux antibiotiques précités. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, espèce naturellement peu perméable, ce type de résistance joue un rôle prépondérant. L'émergence de tels mutants, d'emblée insensibles à plusieurs familles d'antibiotiques, peut poser de réels problèmes thérapeutiques. Il est également important de mentionner certaines mutations chez *Citrobacter, Enterobacter, Serratia,* et *Pseudomonas* dont la conséquence est une hyperproduction de céphalosporinase, enzyme dont le gène est naturellement présent dans le chromosome de ces différentes espèces. La production accrue de cette enzyme capable d'hydrolyser certaines céphalosporines se traduit par une élévation considérable du niveau de la résistance naturelle de ces bactéries à ces antibiotiques. La sélection, lors d'un traitement, de souches portant de telles mutations est une cause fréquente d'échec thérapeutique. Enfin, certaines mutations dans des gènes régulateurs de bactéries à Gram négatif entraînent une activation de pompes à efflux capables d'expulser hors de la bactérie des antibiotiques appartenant à des familles différentes (chloramphénicol, quinolones, tétracyclines). Il en résulte une sensibilité moindre à ces composés.

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène (gène de résistance) représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. Dans ce cas, le ou les gènes nouvellement acquis codent pour des protéines capables:

- de diminuer la concentration intracellulaire de l'antibiotique. Il s'agit dans ce cas de gènes dont le produit est une protéine membranaire qui refoule activement l'antibiotique hors de la bactérie en utilisant comme source d'énergie le gradient de protons transmembranaire ou l'ATP cytoplasmique. Chez les bactéries à Gram négatif, l'activité des systèmes d'efflux est couplée à celle de porines qui permettent aux molécules de traverser la membrane externe et de ne pas s'accumuler dans l'espace périplasmique.
- d'inactiver (détoxifier) l'antibiotique. Cette inactivation se traduit par la perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Il s'agit du mécanisme de résistance le plus répandu dans la nature. L'inactivation peut être extra- ou intra-cellulaire. Ainsi, les ß-lactamines, dont la cible est extracellulaire, sont inactivées par des enzyme dénommées ß-lactamases excrétées dans l'espace périplasmique (bactéries à Gram négatif) ou dans le milieu de culture (bactéries à Gram positif). Le chloramphénicol et les aminosides, par contre, sont inactivés dans le cytoplasme de la bactérie par des enzymes qui demeurent intracellulaires.
- de modifier la cible de l'antibiotique. Il en est ainsi de la résistance aux macrolides où l'ARN ribosomal 23S, cible de ces molécules perd son affinité pour l'antibiotique après modification par une méthylase.
- de substituer une cible insensible à celle, sensible, normalement présente dans la bactérie (*i.e.,* mise en place d'une dérivation métabolique). La particularité de ce dernier mode de résistance est la présence, dans la même bactérie, de deux enzymes catalysant la même réaction (isoenzymes ou alloenzymes), l'une sensible et l'autre résistante à l'antibiotique. La cellule bactérienne devient donc diploïde (possédant deux informations génétiques) pour le même caractère. Pour que la résistance soit observée, il est indispensable que le gène codant pour une enzyme sensible soit récessif par rapport à celui codant pour une enzyme résistante à l'effet inhibiteur de l'antibiotique. C'est le cas, notamment, des gènes de résistance aux sulfamides et au triméthoprime qui sont

respectivement des inhibiteurs des dihydroptéroates synthétases et des dihydrofolates réductases bactériennes, enzymes impliquées dans la biosynthèse d'un acide nucléique, la thymine. L'opéron *van,* responsable de la résistance à la vancomycine chez les entérocoques, code pour une élégante alternative qui consiste, en plus de la synthèse d'une nouvelle cible insensible à l'antibiotique, à supprimer la synthèse de la cible sauvage [6].

La résistance par acquisition de gènes concerne la quasi-totalité des antibiotiques et les rares molécules pour lesquelles aucune résistance par acquisition d'information génétique n'a été détectée sont l'acide fusidique, les furanes et les polypeptides (bacitracine, colistine, polymixine B).

II. Dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

La dissémination de gènes de résistance à des genres bactériens auparavant sensibles est un des principaux facteurs de l'évolution préoccupante de la résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance, comme n'importe quel gène bactérien, peuvent être transférés de bactérie à bactérie par transduction, transformation ou conjugaison. La transduction est un mécanisme de transfert de gènes dont le vecteur est un virus bactérien appelé bactériophage. Du fait de la spécificité d'infection des phages, ce mécanisme permet le transfert d'information génétique entre bactéries appartenant essentiellement au même genre. La transduction participe efficacement au transfert de gènes entre bactéries phylogénétiquement proches mais non entre bactéries distantes. La transformation permet l'acquisition et l'incorporation d'ADN exogène nu par une bactérie en phase de compétence. Ce mode de transfert de gènes, assez peu répandu dans le monde bactérien, a été décrit chez certaines bactéries à Gram négatif appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, et *Neisseria* et chez certaines bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Bacillus* et *Streptococcus*. A l'exception remarquable de *Neisseria* et *Haemophilus*, où l'ADN ne pénètre dans la bactérie que s'il possède de courts motifs nucléotidiques spécifiques de genre, la transformation permet un brassage d'information génétique entre des bactéries très distantes sur le plan phylogénétique. Chez certaines espèces bactériennes, la transformation permet la création de gène cible chimère résistant aux antibiotiques (Voir "Transformation et résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque »). La conjugaison est un processus au cours duquel de l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par un mécanisme complexe nécessitant un étroit contact cellulaire. Ce mode de transfert a été décrit chez la quasi-totalité des espèces bactériennes. Il contribue pour une grande part à la circulation horizontale d'information génétique chez les procaryotes et joue certainement un rôle majeur dans l'évolution des espèces bactériennes. Certains systèmes conjugatifs ont un spectre d'hôte très étendu puisque des transferts conjugatifs entre bactéries à Gram négatif et à Gram positif et des procaryotes aux eucaryotes ont été décrits. Il s'agit toutefois de transferts effectués dans les conditions du laboratoire avec des vecteurs spécialisés. Il est vraisemblable que, dans les conditions naturelles, ce type de transfert soit excessivement rare, voire inexistant, et beaucoup plus limité dans leur étendue. Les gènes nécessaires aux transferts conjugatifs sont généralement portés par des plasmides dits conjugatifs ou, plus rarement, par des éléments transposables dénommés transposons conjugatifs.

Quel que soit le processus impliqué (transduction, transformation, conjugaison), le transfert d'un gène de résistance entre deux germes pathogènes sera d'autant plus efficace que la distance génétique entre les bactéries impliquées est faible. Les bactéries possèdent cependant des structures génétiques particulières, les plasmides et les transposons, qui favorisent les transferts de

gènes de résistance entre bactéries (Voir cours éléments génétiques mobiles). Les gènes de résistance aux antibiotiques sont fréquemment situés sur des plasmides ce qui rend compte de la facilité avec laquelle les résistances acquises, par opposition aux mutations chromosomiques, peuvent être disséminées dans le règne bactérien et poser de très difficiles problèmes thérapeutiques. Les bactéries peuvent héberger plusieurs plasmides de résistance et il n'est pas rare qu'un même plasmide véhicule plusieurs gènes de résistance. Dans un tel cas, ils peuvent déterminer chez un même hôte la résistance jusqu'à parfois cinq ou six familles d'antibiotiques. L'acquisition par une bactérie sensible d'un plasmide hébergeant plusieurs gènes de résistance lui permet de devenir multirésistante en une seule étape. Cet événement est généralement obtenu avec des fréquences très supérieures à celles qui permettent d'obtenir une résistance à un seul antibiotique par mutation. Les plasmides de résistance ont été trouvés dans toutes les espèces où ils ont été recherchés à l'exception de *Streptococcus pneumoniae*, espèce bactérienne pour laquelle l'émergence de souches multirésistantes est due à l'acquisition de transposons qui se sont intégrés dans le chromosome.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que les plasmides de résistance des bactéries à Gram négatif et à Gram positif étaient susceptibles d'évoluer *in vivo* par acquisition ou pertes successives de déterminants de la résistance. Cette évolution, qui rend partiellement compte de l'émergence de souches multirésistantes, est une conséquence du caractère transposable de nombreux gènes de résistance (voir cours les éléments génétiques mobiles). Tout gène peut être situé sur un transposon pourvu que s'exercent des pressions de sélection suffisantes et, de fait, de très nombreux gènes de résistance sont situés sur des éléments transposables. Certains transposons possèdent la particularité de pouvoir faire évoluer rapidement le répertoire de gènes de résistance qu'ils contiennent (Voir cours "éléments génétiques mobiles"). Dans un environnement donné, les événements de transposition aboutissent rapidement à la construction modulaire *in vivo* de l'espèce plasmidique la mieux adaptée à la vie de la bactérie. Les transposons sont également susceptibles de participer activement à la dissémination de gènes entre des bactéries phylogéniquement éloignées, en permettant l'implantation d'un caractère là où celle d'un plasmide échoue (Fig. 3). Dans ce cas, après transfert, l'élément transposable va quitter le plasmide, incapable de se répliquer dans ce nouvel hôte, pour s'intégrer dans son chromosome. Il pourra dès lors coloniser des plasmides dont les machineries de réplication sont adaptées à cette espèce bactérienne, puis disséminer à d'autres bactéries sensibles appartenant à la même espèce ou au même genre bactérien. Un tel scénario est vraisemblablement à l'origine de l'émergence de souches multirésistantes de *Haemophilus influenzae* qui, jusqu'en 1972, était sensible à tous les antibiotiques. L'analyse du support génétique de ces caractères a montré que la résistance était due à la présence, sur des plasmides endogènes au genre *Haemophilus*, de transposons homologues à ceux des entérobactéries. Chez les bactéries à Gram positif, la dissémination de la résistance transposable à la gentamicine des staphylocoques aux entérocoques, observée dans les années 1980, s'est effectuée selon un mode similaire et l'on assiste maintenant à l'émergence de cette résistance chez les streptocoques. Ce dernier exemple fait redouter des transferts effectués en sens inverse qui permettraient la dissémination de la résistance transposable à la vancomycine des entérocoques à d'autres pathogènes à Gram positif comme le pneumocoque, les staphylocoques ou *Listeria*. Ces données illustrent bien le fait que les déterminants de résistance circulent aisément entre les pathogènes à Gram négatif, d'une part, et à Gram positif, d'autre part. Les limites dans lesquelles des bactéries phylogéniquement distantes peuvent échanger de l'information

génétique dans les conditions naturelles ont été repoussées par la démonstration de transferts horizontaux de gènes de résistance des bactéries à Gram positif vers celles à Gram négatif, c'est à dire entre deux branches évolutives qui se sont séparées il y a environ un million d'années.

III.Evolution et origine des gènes de résistance aux antibiotiques.

Des gènes conférant des phénotypes de résistance nouveaux sont régulièrement mis en évidence. Cette évolution est souvent la conséquence de l'utilisation d'un nouvel antibiotique, ou du nouvel usage thérapeutique d'un ancien antibiotique. Dans de rares cas, l'émergence de nouveaux types de résistance est la conséquence de mutation(s) ponctuelle(s) qui modifient un gène de résistance déjà connu. Ainsi, les gènes de structure de certaines ß-lactamases susceptibles d'hydrolyser les céphalosporines dérivent par mutations d'un gène codant pour une enzyme dont la spécificité était restreinte aux pénicillines. Ces mutations ont entraîné un élargissement du spectre de l'enzyme qui possède maintenant une double activité, pénicillinase et céphalosporinase.

Dans la majorité des cas, cependant, l'apparition d'un phénotype de résistance nouveau peut être associée à un gène nouveau ce qui pose le problème de son origine. De nombreuses études épidémiologiques ont montré que les gènes de résistance apparaissaient peu de temps après l'utilisation des molécules auxquelles ils confèrent la résistance. La rapidité avec laquelle ces gènes apparaissent indique qu'ils préexistent dans les populations bactériennes. Un médecin militaire anglais, E. G. Murray, avait collecté entre les deux guerres mondiales, c'est-à-dire avant « l'ère antibiotique » des souches bactériennes pathogènes de par le monde. L'analyse de cette collection bactérienne, composée essentiellement de bactéries à Gram négatif, a montré que ces souches ne possédaient aucun gène de résistance aux antibiotiques bien qu'elles hébergeaient des plasmides similaires à ceux isolés actuellement dans les mêmes espèces. L'émergence des gènes de résistance chez les bactéries pathogènes est donc un phénomène récent qui traduit l'adaptation des bactéries à un changement d'environnement provoqué par l'utilisation des antibiotiques. La majorité des antibiotiques est produit par des bactéries du sol appartenant au genre *Streptomyces* qui, pour résoudre le problème de l'autotoxicité, utilisent des mécanismes de résistance similaires à ceux rencontrés chez les bactéries pathogènes pour l'homme: efflux actif ou inactivation de l'antibiotique, altération de la cible. Ces gènes sont indispensables à la survie de ces bactéries productrices et leur présence est donc très antérieure à l'utilisation thérapeutique des antibiotiques. Cette observation a conduit différents auteurs a suggérer que les gènes de résistance présents chez les bactéries pathogènes pouvaient être issus des microorganismes producteurs d'antibiotiques. La comparaison de séquences nucléotidiques des gènes codant pour des mécanismes de résistance similaires chez les microorganismes producteurs d'antibiotiques et chez les bactéries pathogènes a montré que cette hypothèse était vraisemblable. Cependant, dans tous les cas étudiés, l'analyse des séquences montrait une forte divergence à partir du gène ancestral commun ce qui implique, dans l'hypothèse adoptée, un transfert de gène très ancien des bactéries productrices aux bactéries pathogènes. Une autre hypothèse, non-exclusive, est que les gènes de résistance dériveraient de certains gènes métaboliques après duplication du gène ancestral. Dans ce cas, une copie du gène conserverait la fonction initiale alors que l'autre évoluerait en gène de résistance. Il a ainsi été suggéré que certaines bêta-lactamases dérivaient de la D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, enzyme impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane.

L'intérêt de cette hypothèse vient du fait que les bêta-lactamines sont des antibiotiques

synthétisées par différentes espèces de *Penicillium*, organismes eucaryotes qui, ne possédant pas la cible de l'antibiotique qu'ils produisent, n'ont donc pas développé de mécanismes de résistance pour leur survie.
Dans ce cas encore, l'analyse de la séquence des gènes incriminés indique une forte divergence évolutive incompatible avec une genèse récente des bêta-lactamases. La possibilité pour certains microorganismes (bactéries, champignons) de produire des substances toxiques auxquelles ils sont insensibles leur confère un avantage sélectif considérable. L'acquisition, par les bactéries sensibles avoisinantes, de mécanismes leur permettant de résister à ces substances a permis à cet écosystème d'atteindre un état d'équilibre. Cette longue adaptation a pu se faire par l'acquisition de gènes préexistants (transfert de gènes à partir des microorganismes producteurs) ou par le développement de mécanismes de résistance originaux par duplication de gènes. Les bactéries du sol non-productrices d'antibiotiques ont pu ainsi constituer un réservoir de gènes de résistance plasmidiques ou transposables qui, à partir des années 1950, ont commencé leur dissémination aux bactéries pathogènes encore sensibles. La détermination de l'origine des gènes de résistance, qui est vraisemblablement multiple, fait toujours l'objet d'intenses spéculations et de nombreux travaux.

IV. Conclusions

Aucune nouvelle famille d'antibiotiques n'a été mise sur le marché depuis 20 ans alors que de nouveaux mécanismes de résistance, souvent sophistiqués, sont régulièrement décrits dans la littérature. Cette évolution traduit bien le fait que, dans ce domaine, l'imagination n'est pas du côté de *Homo sapiens*. L'avenir d'une antibiothérapie toujours efficace repose en partie sur la capacité de l'industrie pharmaceutique à développer de nouvelles molécules « plus résistantes » mais surtout, peut-être, à caractériser de nouvelles cibles bactériennes. Les connaissances issues des programmes de séquençage systématique des génomes bactériens seront sans doute décisives pour cette dernière approche. Il est également urgent que nos habitudes concernant l'utilisation des antibiotiques évoluent. Ainsi, avec un choix plus judicieux des molécules utilisées en agronomie et en médecine vétérinaire, on devrait éviter la sélection de germes résistants à des antibiotiques utilisés en médecine humaine. Dans le domaine de la santé publique, il est important de continuer à développer les activités d'hygiène hospitalière pour que ces sites, qui hébergent sans aucun doute la plus grande variété de germes pathogènes et de gènes de résistance, ne contribuent pas à leur dissémination.

V. Références bibliographiques

J. Duval, « Classification et mécanismes d'action des agents antibactériens », *in* L. LeMinor et M. Véron (éds), *Bactériologie Médicale*, Flammarion, 1989.

J. Sirot, « Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques *in vitro* », *in* L. LeMinor et M. Véron (éds), *Bactériologie Médicale*, Flammarion, 1989.

P. Courvalin et A. Philippon, « Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques », *in* L. LeMinor et M. Véron (éds), *Bactériologie Médicale*, Flammarion, 1989.

« Antibiotiques » , Médecine Thérapeutique, hors série n°1, 1997.

H. Leclerc, J.-L. Gaillard et M. Simonet, « Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien », Doin Editeurs, 1995.

"Dossier antibiotiques" La recherche, 314, 1998.

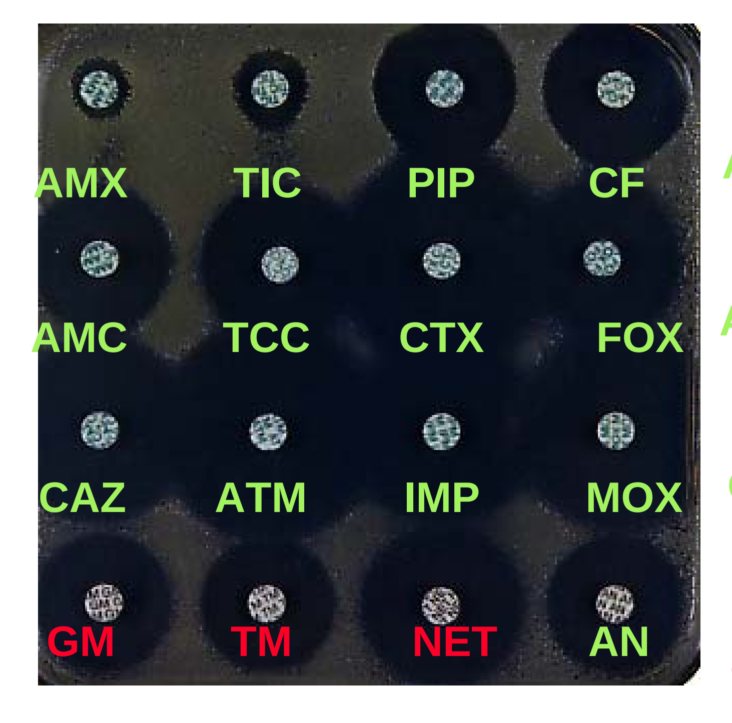
Tableau 1. Résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes par acquisition de gènes.

Mécanismes	Antibiotiques
Efflux de l'antibiotique	Tétracyclines, macrolides, quinolones (un cas)
Inactivation de l'antibiotique	ß-lactamines, aminosides, chloramphénicol, fosfomycine, MLS, nitro-imidazoles
Modification de la cible	MLS
Substitution de la cible	Sulfamides, triméthoprime, glycopeptides

Figure 1

Fig. 1. Etude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques de deux souches de *Klebsiella pneumoniae*par la technique de l'antibiogramme en milieu gélosé. La méthode consiste à déposer à la surface de la gélose nutritive ensemencée en bactéries des disques de papier buvard contenant une quantité définie des antibiotiques à étudier. Les molécules diffusent radialement dans la gélose pour constituer un gradient de concentration qui permet de déterminer l'effet bactériostatique de chaque antibiotique. La sensibilité d'une souche se traduit par une forte inhibition de sa croissance autour d'un disque (présence d'un halo de grand diamètre). A l'inverse, lorsqu'une souche est résistante, elle se développe au contact ou à proximité du disque (absence ou présence d'un faible halo). L'antibiogramme (A) est celui d'une souche ayant un phénotype sauvage, cette espèce est naturellement résistante à l'amoxicilline (AMX), à la ticarcilline (TIC) par production d'une pénicillinase naturelle chromosomique dénommée SHV-1. Cette enzyme est ihnibée par l'acide clavulanique, un inhibiteur de pénicillinase, qui est présent dans les disques d'augmentin (association d'amoxicilline+ acide clavulanique) (AMC) et de claventin (association ticarcilline + acide clavulanique) (TCC), entraînant la restauration de la sensibilité de la souche à ces deux antibiotiques. L'antibiogramme (B) est celui d'une souche ayant acquis des résistances, elle est résistante à e nombreux antibiotiques de la famille des béta-lactamines, pénicilline A (AMX), carboxy-pénicilline (TIC), uréido-pénicilline (PIP), céphalosporines de première génération (CF), et céphalosporines de troisième génération (CTX, CAZ). Cette résistance acquise est liée à l'acquisition d'un gène plasmidique codant pour une ß-lctamase à spectre étendu. Cette souche a également acquis des gènes de résistance aux aminosides (AN, TM, NET).

Fig. 1



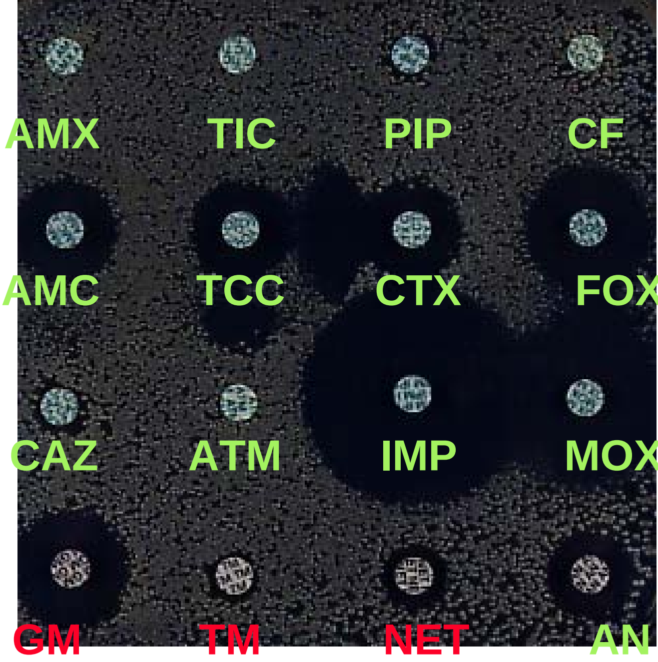


Figure 2

Fig. 2. Représentation schématique des principales structures pariétales bactériennes. Le constituant commun est la membrane cytoplasmique (MC) et le peptidoglycane (PG), structure poreuse rigide qui détermine la forme des bactéries. Les bactéries à Gram négatif et les mycobactéries possèdent une structure externe supplémentaire très filtrante, la membrane externe (ME) qui est séparé du peptidoglycane par l'espace périplasmique (EP). Les composants essentiels de la ME des Gram négatifs sont les lipopolysaccharides (LPS) et les phospholipides (PL), ceux des mycobactéries sont les acides mycoliques et l'arabinogalactane (AG). Des protéines spécialisées de la membrane externe s’associent en trimères pour former des porines (P) qui permettent à de nombreuses molécules, dont les antibiotiques, de franchir cette barrière. La résistance naturelle des Gram négatifs et des mycobactéries aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe. Les mycoplasmes sont des bactéries pathogènes phylogéniquement apparentés aux Gram positifs qui sont dépourvus de peptidoglycane.

Antibiotique

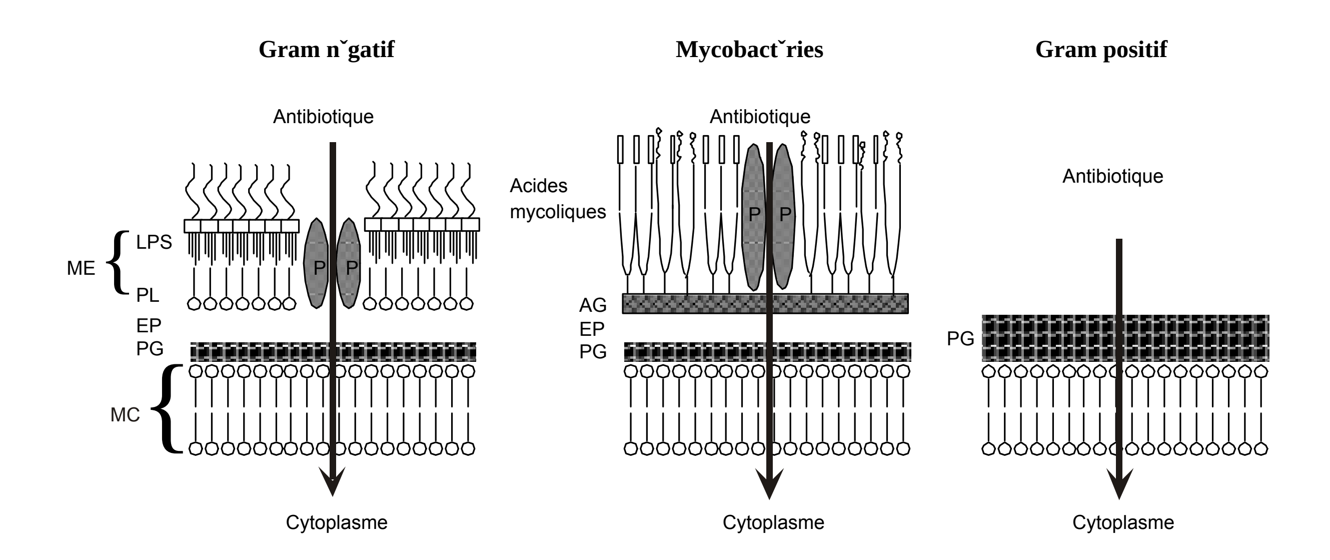


Fig. 2

Figure 3

Fig. 3. Mobilité intra- et intercellulaire d'un transposon de résistance aux antibiotiques. L'élément transposable présent dans la bactérie donatrice A peut transposer en un autre point du chromosome (chr), sur le plasmide non-conjugatif P1, ou sur le plasmide conjugatif P2. Son insertion sur le plasmide P2 lui permet d'être transféré passivement par conjugaison à une bactérie réceptrice B. Si le plasmide P2 ne peut se répliquer dans la bactérie B, la survie du transposon dépendra de sa capacité à s'intégrer dans le chromosome de l'hôte, cible la plus probable en raison de sa taille. Il pourra dès lors coloniser des plasmides plus adaptés au genre bactérien B pour poursuivre sa dissémination.

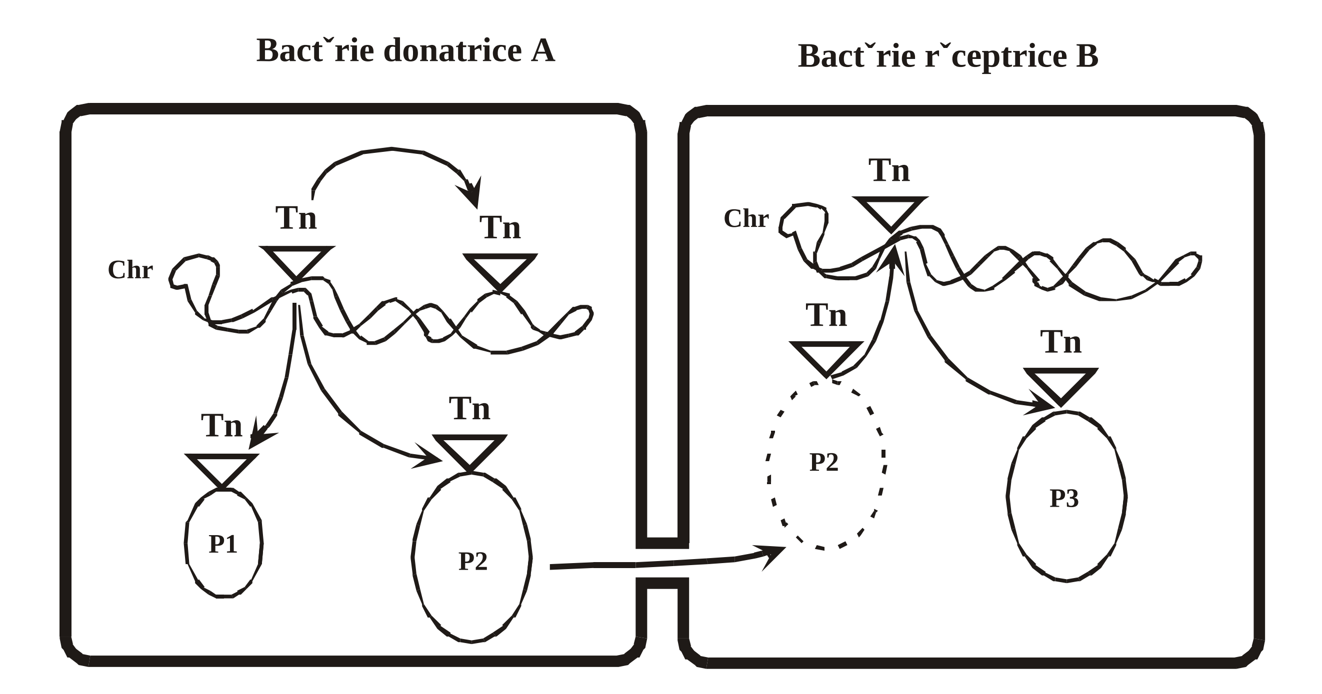


Fig. 3

La résistance bactérienne aux antibiotiques

Définitions

Les antibiotiques sont des substances qui inhibent la croissance bactérienne. L'action d'un antibiotique sur une bactérie est caractérisée par 2 paramètres: (1) la concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance des bactéries à 37°C en 18-24 h ; (2) la concentration minimale bactéricide(CMB) est la plus faible concentration d'antibiotique détruisant 99,9% de la population bactérienne après 18-24 h d'incubation. Un antibiotique est dit bactéricide quand le rapport CMB/CMI est égal à 1 ou 2, bactériostatique quand le rapport CMB/CMI est supérieur ou égal à 4.
Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration élevée d'antibiotique. La résistance prend en compte la pharmacocinétique de l'antibiotique chez les patients. Une souche est dite résistante à un antibiotique si sa CMI est supérieure à la concentration sanguine maximale d'anti-biotique (non toxique) obtenue lors du traitement
On distingue :
(1) la résistance naturelle ou "innée" des espèces bactériennes dont les souches ''sauvages'' résistent naturellement à certains antibiotiques ; par exemple, les streptocoques sont résistants aux aminosides, les bactéries à Gram négatif aux glycopeptides, les bactéries à Gram positif aux polymyxines.
(2) la résistance acquise est une propriété nouvelle qui apparaît chez les espèces bactériennes jusqu'alors sensibles aux antibiotiques, cette résistance correspondant à une adaptation des bactéries aux antibiotiques.

Déterminisme génétique de la résistance acquise aux antibiotiques

Les mutations chromosomiques

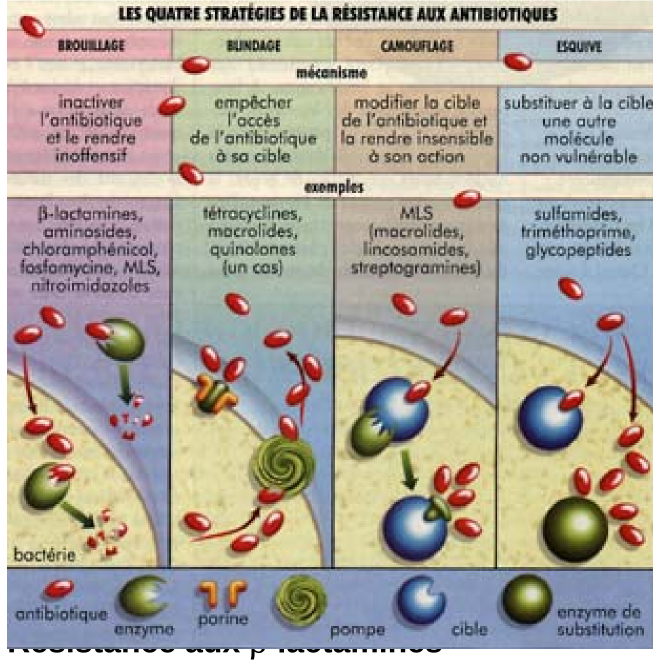
Des mutations chromosomiques peuvent modifier les cibles des antibiotiques comme les transpeptidases (PBPs), l'ADN gyrase, les protéines ribosomales, l'ARN polymérase, ou encore les porines. Ces mutations peuvent entraîner une modification de certaines structures cellulaires, par exemple de la paroi pour les PBPs, ou de certaines fonction, comme la perméabilité de la membrane externe. Ces mutations sont des événements rares survenant à un taux de 10^{-6} à 10^{-9} . Ce type de résistance est stable, transmis à la progénie mais non transmissible horizontalement à d'autres bactéries. Le plus souvent, une mutation entraîne la résistance pour un antibiotique ou des antibiotiques appartenant à la même famille . Cependant, une mutation peut également entraîner la résistance à plusieurs antibiotiques par imperméabilité. L'antibiotique n'est pas directement mutagène mais il sélectionne les rares mutants résistants spontanés au sein d'une population bactérienne sensible.

L' acquisition de gènes de résistance
Cette résistance est due à l'acquisition d'information génétique exogènes portés par des plasmides ou des transposons. Elle concerne la quasi-totalité des antibiotiques et correspond à la majorité des cas isolés en clinique. Cette résistance entraîne la synthèse par les bactéries réceptrices de ce matériel génétique de protéines nouvelles qui vont soit : modifier le système de transport de l'antibiotique (efflux), inactiver l'antibiotique (enzymes…), modifier la cible de l'antibiotique (PBPs…), ou encore substituer une cible insensible à une cible sensible (PBPs…).

Mécanismes biochimiques de la résistance acquise aux antibiotiques

Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques sont donc : l'imperméabilité, l'inactivation de

l'antibiotique, l'altération de la cible cellulaire de l'antibiotique, le reflux actif (efflux) de l'antibiotique.



Résistance aux β-lactamines

Les β-lactamines inhibent l'activité des transpeptidases ou PBPs (*Penicillin binding Proteins*, protéines liant la pénicillines), enzymes de synthèse du peptidoglycane situées à la face externe de la membrane cytoplasmique. Les β-lactamines se fixent dans le site actif de ces enzymes. L'inhibition de la synthèse du peptidoglycane entraîne un arrêt de la multiplication bactérienne.

Il existe de nombreux mécanismes de résistance aux β-lactamines :

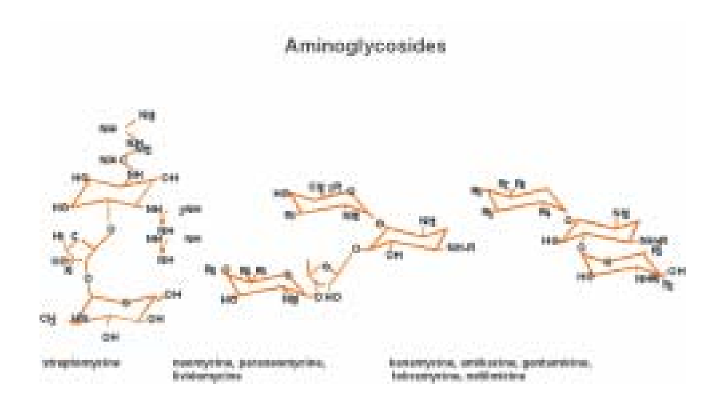
(1) La résistance par imperméabilité de l'enveloppe des bactéries est uniquement décrite chez les bactéries à Gram négatif, avec une membrane externe et des porines, trimères insérés dans cette enveloppe très hydrophobe et laissant passer des petites molécules hydrophiles (<6000 Da). Il peut s'agir d'une diminution quantitative d'un ou plusieurs types de porines ou d'une modification de la structure d'une des porines essentielles.

(2) La résistance par inactivation de l'antibiotique peut être due à la synthèse d'une enzyme (β-lactamase) capable d'inactiver la β-lactamine par ouverture du cycle β-lactame. Chez les bactéries à Gram négatif, les β-lactamases sont localisées dans l'espace périplasmique. Chez les bactéries à Gram positif , ces enzymes sont sécrétés et libérer dans le milieu extracellulaire.

(3) la résistance par modification de la cible (mutation et transformation) est liée à une modification des PBPs, surtout chez les bactéries à Gram positif (*Streptoccoccus pneumoniae*…), voir à l'acquisition d'une nouvelle PBP par un transposon (*Staphylococcus aureus*).

Résistance aux aminosides

Les aminosides agissent sur certaines protéines ribosomales et inhibent la synthèse protéique.



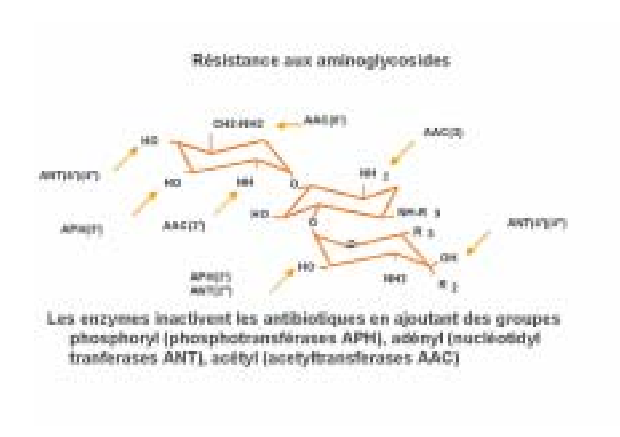
Les mécanismes de la résistance aux aminosides sont nombreux . Il peut s'agir :

(1) d'une modification de la cible ribosomale des aminosides par mutation ponctuelle d'une protéine entraînant une diminution de l'affinité du ribosome pour l'antibiotique.

(2) d'une altération du transport des aminosides, soit qu'ils ne puissent pas pénétrer dans l'espace périplasmique des bactéries Gram négatif par imperméabilité (mutants des porines de la membrane externe), soit que les antibiotiques soient incapables de traverser la membrane cytoplasmique (mutants de transport actif).

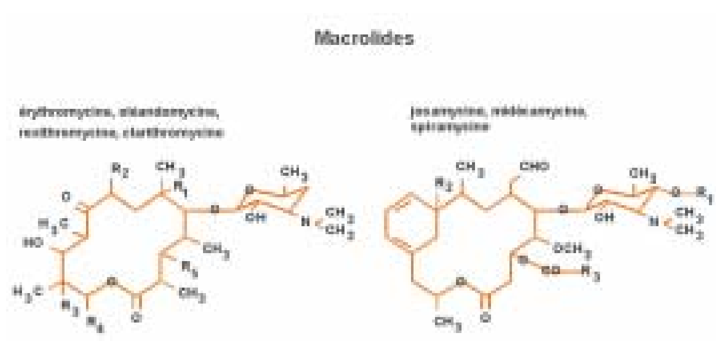
(3) souvent d'une inactivation des aminosides par production d'enzymes par acquisition de gènes de résistance codant ces enzymes. Il existe 3 classes d'enzymes modifiant les aminosides : les aminosides-phosphotransférases (APH) qui phosphorylent un groupement OH ; les aminosides-nucléotidyltransférases (ANT) qui adénylent un groupement OH ; et les

aminosides-acétyltransférases (AAC) qui acétylent un groupement NH2. Ces enzymes largement répandues chez les bactéries à Gram positif et négatif sont très nombreuses et peuvent coexister dans une même bactérie.

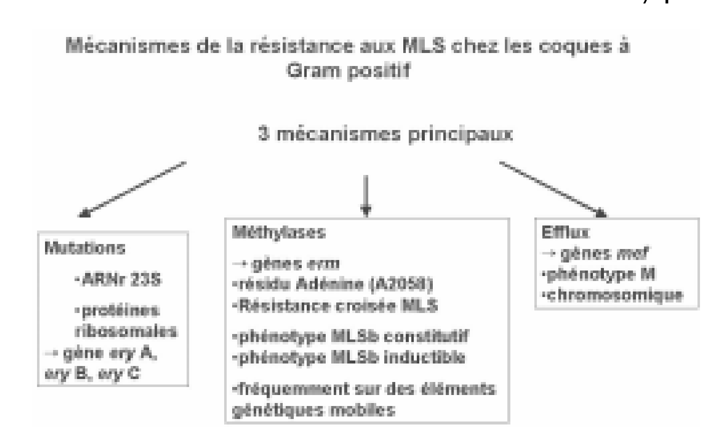


Résistance aux macrolides-lincosamines-synergistines (MLS)

Les macrolides agissent sur des protéines ribosomiques en inhibant la synthèse protéique par interaction avec la sous-unité ribosomale 50S. Les macrolides sont bactériostatiques pour la plupart de antibiotiques et bactéricides pour quelques espèces Gram positif.



La résistance acquise provient d'une modification de la cible ribosomale par une ARN méthylase qui méthyle l'ARN 23 S de la sous-unité ribosomale 50 S, d'une inactivation enzymatique des antibiotiques par synthèse d'une érythromycine-estérase, ou encore d'une imperméabilité de l'enveloppe bactérienne.



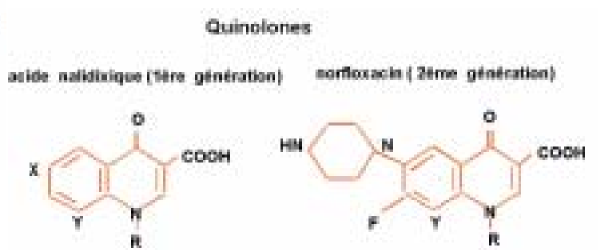
Mécanismes de la résistance aux MLS chez les cocci à Gram positif

- Phénotype MLSb constitutif :
  - Erythromycine R (CMI >128 mg/l)
  - Clindamycine, Lincomicine R (CMI >128 mg/l)
  - Pristinamycine I/S (CMI 0,5 mg/l)
- Phénotype MLSb inductible :
  - Erythromycine R (CMI >128 mg/l)
  - Clindamycine, Lincomicine S (CMI < 0,25 mg/l)
  - Pristinamycine S (CMI < 0,25 mg/l)

Résistance de bas niveau par un mécanisme d'efflux
- (mefE) (CMI = 4-16 mg/L)
- Erythromycine R (CMI 1-8 mg/l)
- Clindamycine, Lincomicine S (CMI 0,125 mg/l)
- Pristinamycine S (CMI 0,5 mg/l)

Résistance aux quinolones

Les quinolones inhibent la réplication du chromosome bactérien avec comme cibles les topoisomérases de type 2 (DNA gyrases A et B) et de type IV.



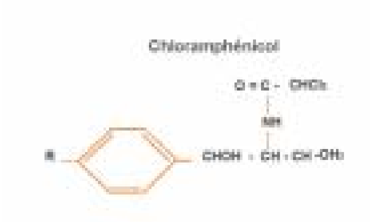
La résistance acquise aux quinolones résulte le plus souvent à de mutations chromosomiques des gènes gyrA et gyrB et de modifications de la topoisomérase IV. La résistance est plus rarement due à une imperméabilité (résistance croisée avec d'autres antibiotiques) ou un mécanisme d'efflux.

Résistance aux tétracyclines
Les tétracyclines sont bactériostatiques et agissent sur des protéines ribosomiques en inhibant la synthèse protéique par interaction avec la sous-unité 30S des ribosomes. La résistance acquise est liée à l'excrétion active de l'antibiotique par des protéines de membrane Tet codés par les gènes *tetA* à *tetG* pour les bactéries Gram positif et *tetL* and *tetK* pour les bactéries Gram négatif.

Tétracyclines
tétracycline, doxycycline, minocycline

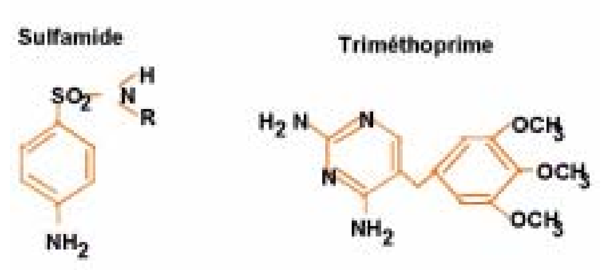
Les mécanismes de résistance peuvent aussi être liés à la protection des ribosomes par des protéines cytoplasmiques codées par les gènes *tetM* à *tetT* (essentiellement chez les bactéries Gram positif), ou encore rarement à l'imperméabilité (résistance et croisée avec d'autres antibiotiques) uniquement chez les Gram négatif.

Résistance aux phénicolés.
Les antiobiotiques apparentés au chloramphénicol sont bactériostatiques et agissent sur la sous-unité ribosomale 50S en inhibant la synthèse protéique.



La résistance peut être principalement due à une inactivation enzymatique par une chloramphénicol-acétyltransférace (CAT). Les dérivés acétylés du chloramphénicol ne peuvent plus se lier au ribosome. Cette résistance habituellement codée par un plasmide est inductible chez les bactéries Gram positif et constitutive chez les bactéries Gram négatif. Plus rarement, il s'agit d'une imperméabilité (résistance croisée avec d'autres antibiotiques) .

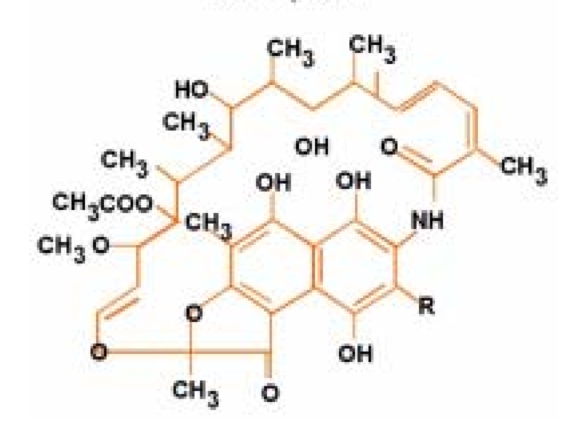
Résistance aux sulfamides et au tri-méthoprine
Les sulfamides inhibent les enzymes impliqués dans la production d'acide tétrahydrofolique (THFA) qui est un cofacteur essentiel à la synthèse des acides nucléiques et de fMet. Ce sont des analogies structuraux de l' acide para-aminobenzoique qui est le substrat du 1[er] enzyme de cette voie de synthèse la dihydropeptéraote synthétase (DHPS). Le triméthroprime (TMP) a une structure similaire à la dihydrofolate réductase (DHFR) et inhibe cette enzyme qui est la dernière étape de cette voie de synthèse.



La résistance aux sulfamides est d'origine chromosomique, due à une diminution de perméabilité, une hyper-production d'acide para-aminobenzoïque, une hyper-production de la DHPS, ou encore à une DHPS mutée résistante. Il existe aussi une résistance plasmidique pour l'acquisition d'une nouvelle DHPS ou diminution de perméabillité.

La résistance au triméthroprime est chromosomique par diminution de perméabilité, hyperproduction de DHFR, auxotrophie pour la thymine, ou production d'une DHPR mutée résistante. La résistance plasmidique permet l'acquisition d'une nouvelle DHFR.

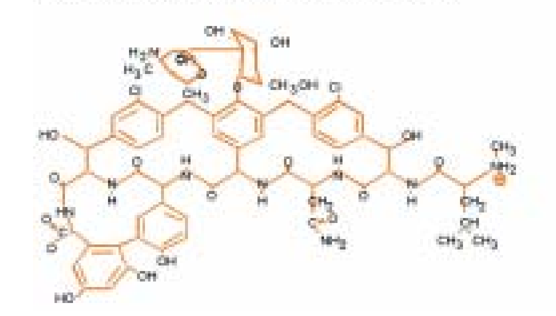
Résistance à la rifampicine

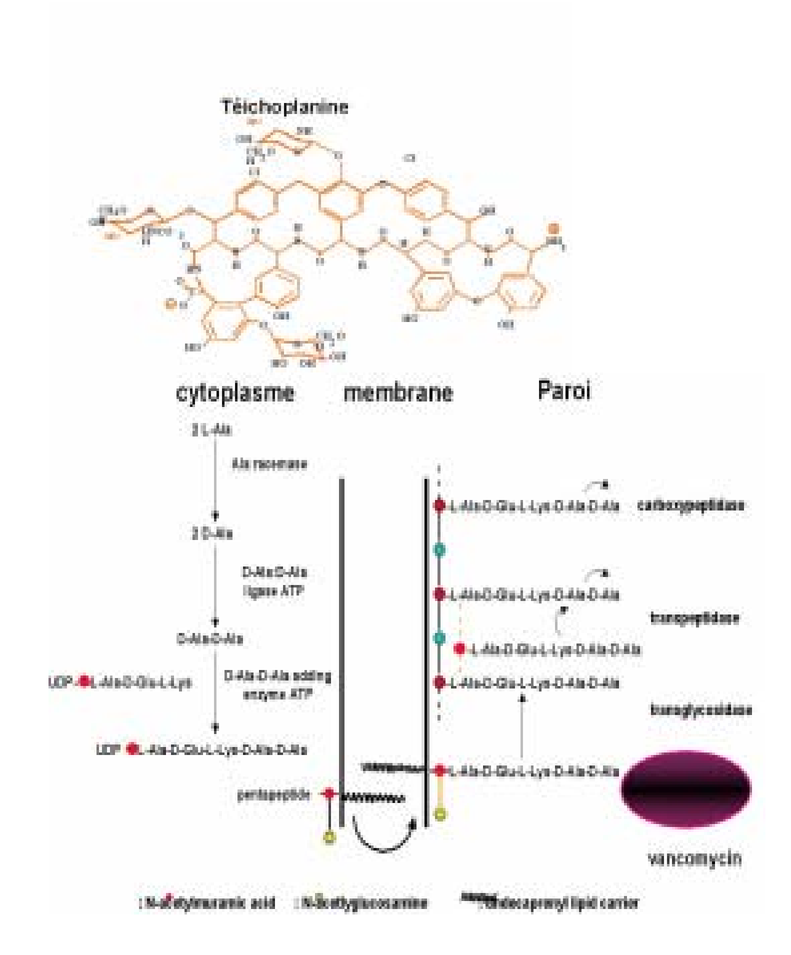


La rifampicine agit en bloquant les RNA polymérases. La résistance acquise est due à des mutations dans la sous-unité ß de la RNA polymérase. Ces mutations surviennent à haute fréquence (10^{-5}-10^{-6}).

Résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides (vancomycine, teïchoplanine) se lient à un précurseur du peptidoglycane, bloquant ainsi la synthèse du peptidoglycane. En se fixant à la portion Dala-Dala de l' UDP-muramyl pentapeptide après son transfert à travers la membrane cytoplasmique, ils inhibent à la fois la transpeptidation et la transglycosylation du peptidoglycane.





Les glycopeptides sont actifs sur les bactéries Gram positif mais pas sur les bactéries Gram négatif car ils ne peuvent franchir l'enveloppe externe.

La résistance à la vancomycine a été décrite en 1988 chez les entérocoques. Deux phénotypes de résistance sont observés :

(1) le phénotype dit *vanA* confère une résistance inductible de haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine ; cette résistance est codée par le gène *vanA* porté par le transposon Tn*1546*

(2) le phénotype dit *vanB* confère une résistance inductible à des niveaux variés pour la vancomycine mais n'atteint pas la teicoplanine ; cette résistance est codée par le gène *vanB* porté par de grands éléments conjugatifs (>100 kb)Cette résistance est maintenant largement répandue chez les entéroroques et constitue un problème majeur pour ces bactéries nosocomiales. De plus, les éléments transposables pourraient potentiellement être transférable, par exemple à des staphylocoques,

Les différents types de résistance acquise aux glycopeptides chez les entérocoques

	VanA	VanB	VanD	VanE
CMI vancomycine	> 64	4-1000	64	16
CMI téicoplanine	> 16	0,5-2	4-16	0,5
Expression	ind	ind	const	ind
Support génétique	Tn1546	Tn1547 Tn1549 Tn5382	Chrom	Chrom
Extrémité cible	D-Ala - D-Lac	D-Ala - D-Lac	D-Ala - D-Lac	D-Ala - D-Ser
Espèce	*Enterococcus* spp.	*E. faecium* *E. faecalis* *E. casseliflavus*	*E. faecium* *E. faecalis*	*E. faecalis*

Les souches de *S aureus* restent habituellement sensibles à la vancomycine. On a récemment décrit des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée à la vancomycine (CMI : 8 mg /L) sans réelle résistance in vivo à cet antibiotique. Ces souches de résistance intermédiaire contre les antibiotiques glycopeptidiques (GISA, Glycopeptide-R *S. aureus*) restent rares en France (<1% des souches). Cependant, une souche de haut ni-veau de résistance à la vancomycine (>30 mg/L) vient d'être signalée en juin 2002 aux USA. De telles souches de *S.aureus* risquent d'être totalement inaccessibles à l'antibiothérapie

Prophylaxie de la résistance

Prévenir l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est basé sur quelques principes simples : (1) utiliser une antibiothérapie ciblée sur la bactérie responsable de l'infection ; (2) prescrire des associations de 2 antibiotiques pour prévenir la résistance par mutations (rifampicine, quinolones, aminosides...) ; (3)multiplier les mesures prophylactiques pour éviter la propagation.

Quelques sujets de réflexion

Existe-il des bactéries responsables d'infections humaines résistantes à tous les antibiotiques?
Quels sont les facteurs favorisants l'émergence de la résistance aux antibiotiques?
Quels sont les problèmes pratiques posés par l'émergence dans un service hospitalier de bactéries multirésistantes aux antibiotiques?

1-Existe-il des bactéries responsables d'infections humaines résistantes à tous les antibiotiques?
Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter
Certaines Entérobactéries

2-Quels sont les facteurs favorisants l'émergence de la résistance aux antibiotiques?
Antibiothérapie mal adaptée ; Antibiothérapie à large spectre ;Antibiothérapie utilisée dans l'industrie agro-alimentaire.

3- Quels sont les problèmes pratiques posés par l'émergence dans un service hospitalier de bactéries multirésistantes aux antibiotiques?
Très grande gravité ; Mesures d'isolement ; Mesures d'hygiène strictes ; Enquête épidémiologique.

Impact de la génomique pour le diagnostic et le traitement des infections bactériennes

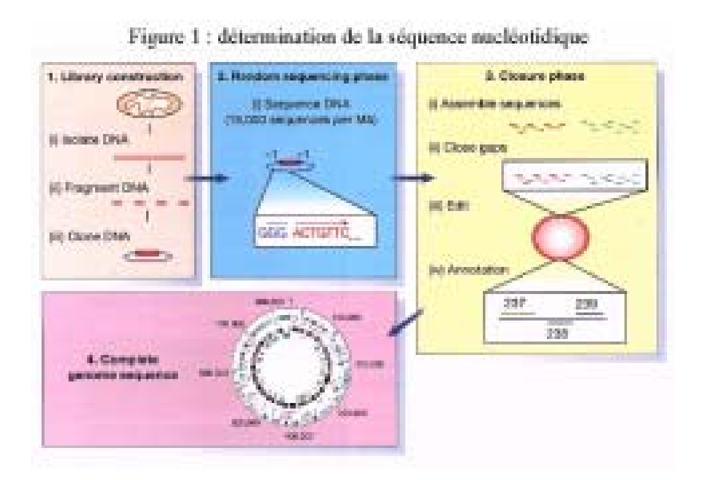
Introduction à la génomique bactérienne

La principale révolution de la dernière décade a été l'amélioration des techniques de séquençage qui ont permis la détermination dès 1995 de la séquence génomique complète d'une souche de *Haemophilus influenzae*. Cet événement a rapidement été suivi par le séquençage du génome de très nombreux microorganismes. Actuellement la séquence de nombreux génomes procaryotes est disponible allant de *Mycoplasma pneumoniae*, le plus petit bactérien, à celui de *Saccharomyces cerivisiae* (13 Mb). Pour certaines espèces bactériennes, la séquence nucléotidique du génome de plusieurs souches est maintenant disponible. Cette révolution technologique se poursuit et l'amélioration constante des techniques de séquençage a permis la réalisation complète de la séquence du génome humain.

Il reste maintenant au biologiste à exploiter cette énorme masse de données afin de permettre une meilleure compréhension de la physiologie des microorganismes, et notamment de l'intégration des bactéries dans leur biotope et des raisons pour lesquelles, dans certaines circonstances, les microorganismes peuvent être responsables d'une pathologie. Cet abord exhaustif a créé l'immense espoir de voir se développer dans un futur proche de nouveaux agents thérapeutiques à visée anti-infectieuse aussi bien curatifs que prophylactiques.

Séquençage d'un génome, en bref.
Le séquençage d'un génome comporte deux parties : la détermination de la séquence nucléotidique et l'annotation (Figures 1 et 2)

Détermination de la séquence nucléotidique.
La stratégie habituellement utilisée consiste à réaliser une banque génomique de la souche à séquencer. Le chromosome de cette souche est cisaillé de façon aléatoire de manière à obtenir des fragments de 1 kb. Ces fragments sont ensuite clonés dans un vecteur classique. Le séquençage de plusieurs milliers de ces clones pris au hasard est ensuite réalisé. Les séquences sont assemblées grâce aux outils informatiques générant ainsi des fragments appelés "contig". La séquence est terminée lorsqu'il existe un seul contig si l'espèce étudiée n'a qu'un seul chromosome ou plusieurs s'il existe plusieurs réplicons.


Figure 1 : détermination de la séquence nucléotidique

Les capacités de séquençage sont telles qu'actuellement pour un génome bactérien une grande partie de ceci peut être réalisée très rapidement, en quelques jours. La finition reste cependant très longue, d'une part certaines régions du chromosome peuvent ne pas être clonables, d'autre part des séquences répétées empêchent l'assemblage final des derniers contigs. Il sera alors nécessaire d'amplifier de grands fragments d'ADN qui devront être séquencés séparément pour être placés sur le chromosome. Ainsi, il est relativement aisé d'obtenir de façon semi-automatisée la séquence de 95% d'un génome bactérien, cependant l'obtention fiable de l'ensemble de la séquence sous la forme d'un seul fragment nécessite plusieurs semaines voire

mois fonction du nombre de séquences répétées et du GC% du génome étudié.
Une liste actualisée des principales espèces bactériennes dont le génome a été séquencé peut être trouvée à l'adresse suivante :

http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/CMRGenomes.spl

L'annotation. L'annotation est une étape capitale qui consiste à déterminer l'organisation du génome et à identifier au sein de la séquence l'ensemble des phases de lecture. Une annotation de bonne qualité est en général réalisée manuellement afin de vérifier la réalité de chaque phase de lecture basée sur l'existence d'homologies et /ou d'un usage de codons. En moyenne dans un génome, 50 à 60 % des phases ont des homologies connues avec d'autres phases de lecture identifiées dans les banques de données et dans les 40 à 50 % restantes, la moitié est spécifique de l'espèce considérée. D'autre part, il est important de souligner qu'homologie ne signifie pas identité fonctionnelle et que la fonction de deux protéines homologues n'est pas forcément identique.

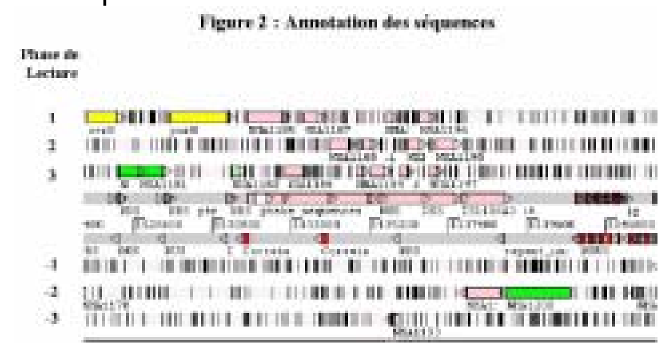


Figure 2 : Annotation des séquences

Exploitation de la séquence du génome des bactéries

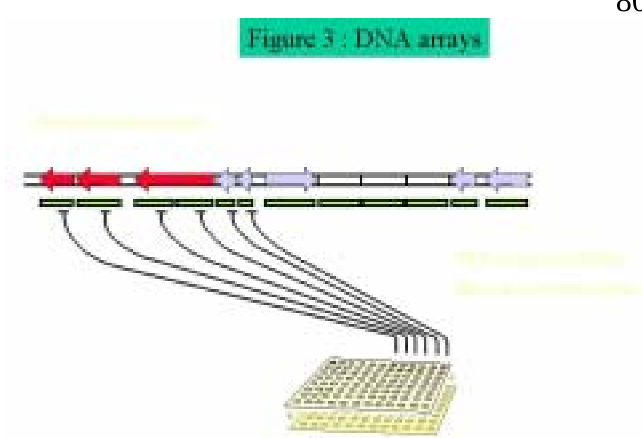
La détermination de la séquence d'un génome bactérien permet de préciser les fondamentaux de la bactérie : taille du génome, GC%, nombre de phases de lecture potentielles, fraction codante du génome et enfin nombre de pseudogènes, qui s'il est important (*Mycobacterium leprae* et *Rickettsia prowazeki*) témoigne d'une réduction génomique en cours. L'analyse de la séquence permet aussi de préciser les voies métaboliques présentes et leur bonne concordance avec la physiologie connue de la bactérie. Mais la seule analyse de la séquence nucléotidique n'apporte que des informations limitées et les seules données de séquence sont loin de résoudre toutes les questions concernant la biologie d'un microorganisme. Différentes possibilités s'ouvrent alors aux microbiologistes pour pousser les investigations.

Comparaison de génomes

La comparaison est une façon simple de *Mycobacterium* « faire parler » les génomes. Dans l'idéal, on dispose de la séquence nucléotidique de plusieurs souches appartenant à la même espèce ou à des espèces proches, il est alors possible de comparer leur séquence et de rattacher les différences à des phénotypes spécifiques d'une souche, tel que le pouvoir pathogène par exemple. Ainsi la séquence nucléotique d'une souche d'*Escherichia coli* K-12, souche de laboratoire non virulente, a été comparée à la séquence d'une souche d'*Escherichia coli* O157/H7 responsable d'entérites hémorragiques. Cette comparaison a révélé qu'il existe un squelette commun de 4100 kb à ces deux souches et que les gènes de ce squelette sont très proches voire identiques (98% d'identité). En revanche, un nombre important de séquences sont spécifiques à chacune des deux souches. Ainsi la souche virulente possède 1340 Kb d'ADN répartis en 177 îlots sur le chromosome ; dont certains étaient connus (gènes codant pour le système de sécrétion de type III permettant l'adhésion intime et la disparition des microvillosités) mais d'autres inconnus jusque là et qui pourraient contribuer au pouvoir pathogène. De façon surprenante, 530 kb d'ADN sont spécifiques de *Escherichia coli* K-12 et ne sont pas retrouvés dans la souche pathogène. Des comparaisons similaires entre *Mycobacterium tuberculosis* et *leprae* ont apporté une explication à l'impossibilité de *M.leprae* de se diviser en dehors de l'homme. En effet alors que le génome de *M.tuberculosis* a une taille de 4,4 Mb celui de *M.leprae* n'est que de 3,3 Mb. A cette perte

de 1000 kb s'ajoute le fait que la séquence codante de ces 3,3 Mb est très faible ceci en raison du nombre important de pseudogènes. On estime ainsi que *M.leprae* a la capacité de produire 2000 protéines de moins que *M.tuberculosis*. Cette réduction de génome explique qu'un nombre important de voies métaboliques manquent chez ce pathogène et empêchent sa croissance *in vitro*.

Dans certaines circonstances, la comparaison de génome n'apporte que des informations limitées, notamment lorsqu'il existe de fréquents transferts horizontaux. Dans ce cas, les différences observées peuvent être spécifiques de la souche dont la séquence est connue et ne pas refléter une différence phénotypique propre au groupe bactérien étudié. Ceci est le cas de *Neisseria meningitidis*, pathogène pour lequel il est intéressant de connaître les différences avec *Neisseria gonorrhoeae* compte tenu des différences évidentes de pouvoir pathogène. A ce jour, la séquence génomique de 2 souches de *N.meningitidis* a été réalisée, une souche de sérogroupe A (Z2491) et une souche de sérogroupe B (MC58), ainsi que la séquence d'un isolat de *N.gonorrhoeae* (FA1090). Des comparaisons de génomes montrent que 17% des phases de lecture de Z2491 ne sont pas dans la souche de gonocoque, mais 8% du génome de Z2491 n'est pas non plus dans l'autre souche de méningococque (MC58), cette importante variabilité de génome entre les souches de *Neisseria* interdit de porter des conclusions quant à l'intérêt des 17% de séquences de Z2491 absentes chez le gonocoque quant à leur rôle dans la spécificité du pouvoir pathogène de *N.meningitidis*. Le seul moyen de pallier à ceci est de comparer plusieurs isolats de *N.meningitidis* avec plusieurs souches de *N.gonorrhoeae* pour ne garder que les séquences communes à tous les méningocoques et absentes des gonocoques. Le moyen le plus efficace pour ceci est l'emploi d' « arrays » (Figure 3).



Pour ce faire, la totalité des gènes d'une bactérie est amplifiée et déposée à l'aide de robots sur une membrane d'hybridation (macroarrays) ou sur une glace de verre (microarrays ou puces à ADN). Ces dernières sont beaucoup plus petites que les macroarrays et permettent le dépôt de plusieurs dizaines de milliers de gènes pour seulement quelques milliers avec les macroarrays. Ces supports solides sont ensuite hybridés avec l'ADN chromosomique des souches dont on désire réaliser la comparaison. La lecture et l'interprétation sont réalisées à l'aide d'une informatique appropriée. Les gènes pour lesquels aucune hybridation n'est détectée sont absents de la souche testée. Bien entendu cette information n'apporte que des renseignements négatifs dans la mesure où il ne tient pas compte d'éventuelles séquences présentes dans l'ADN testé mais cette fois absentes de la souche avec laquelle l'array a été construit. De telles comparaisons portant sur un grand nombre de souches appartenant au même genospecies mais exprimant différents niveaux de virulence apporteront des renseignements quant aux mécanismes du pouvoir pathogène.

Etude du transcriptome

Le transcriptome est l'identification de l'ensemble des gènes qui sont exprimés dans une situation donnée. L'emploi d' arrays permet de quantifier le niveau d'expression de chaque gène. Pour ce faire, les supports solides sont hybridés non plus avec l'ADN génomique d'une souche mais avec l'ARN extrait de la souche. En

comparant le profil d'expression dans deux conditions différentes, il est possible d'obtenir des informations importantes sur la régulation des gènes. En fonction de l'environnement dans lequel la bactérie se développe, le transcriptome varie et permet ainsi de préciser les gènes préférentiellement exprimés. Le regroupement de ces gènes permet l'identification des « clusters » dont l'expression est nécessaire dans tel ou tel environnement.

Etude du protéome

Le but est d'identifier l'ensemble des protéines produites par une bactérie et de rattacher chaque protéine à une phase de lecture. Là encore, il existe une variabilité en fonction des conditions de croissance. La comparaison protéome-transcriptome sera nécessaire.

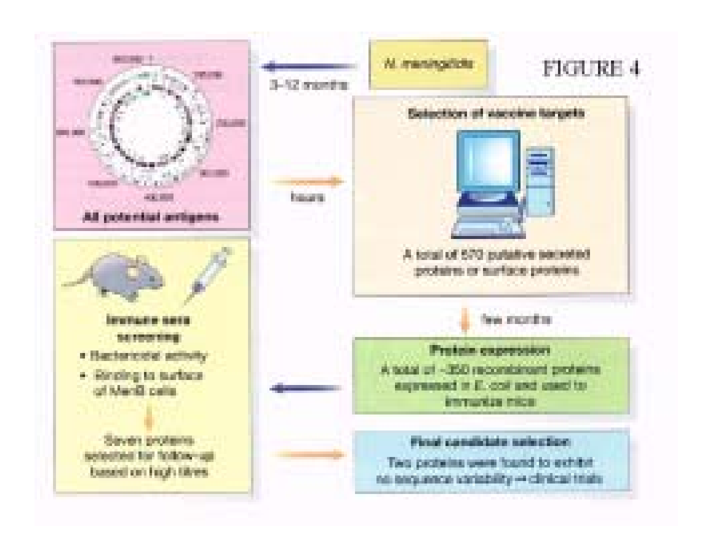
Application de la génomique

Trois ordres d'application vont directement découler de la génomique :

Application au diagnostic

Des puces à ADN comportant des amplicons porteurs de facteurs de virulence, des gènes de résistance aux antibiotiques, et des séquences spécifiques d'espèce vont apparaître. L'introduction de cette technologie dans les laboratoires de routine devrait permettre d'améliorer et d'accélérer le diagnostic microbiologique ainsi que la détermination des résistances. Fait important l'adjonction au sein de ces puces de gènes correspondant à des facteurs de virulence permettra d'identifier des pathotypes et donc d'adapter la décision thérapeutique au risque infectieux réel.

Application à la recherche d'antigènes vaccinaux (Figure 4).



Le meilleur exemple de cette application est la recherche d'antigènes vaccinaux contre le méningocoque. Un antigène vaccinal protéique contre *Neisseria meningitidis* doit être conservé, situé dans la membrane externe, et induire des anticorps bactéricides. Une analyse fine de la séquence génomique a permis de repérer l'ensemble des protéines qui sont dans la membrane externe (~ 300). Ces protéines ont été purifiées. Des anticorps ont été produits contre ces protéines et le pouvoir bactéricide de ces anticorps déterminé. 7 de ces protéines induisent la formation d'anticorps bactéricides et constituent donc de bons candidats vaccinaux.

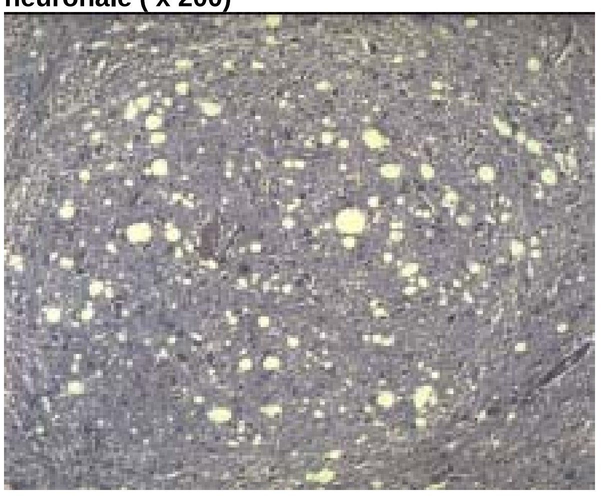
Découverte de nouveaux agents anti-infectieux.

Il s'agit essentiellement d'antibiotiques qui doivent inhiber la croissance bactérienne. Le jeu consiste à identifier de nouvelles cibles pour de nouvelles classes d'antibiotiques. Le préalable est l'identification des gènes essentiels, c'est à dire les gènes qui ne peuvent être mutagénisés car indispensables à la croissance bactérienne. Ceux qui seront conservés au sein d'un groupe bactérien peuvent éventuellement servir de cible pour de nouvelles classes d'antibiotiques.

Prions

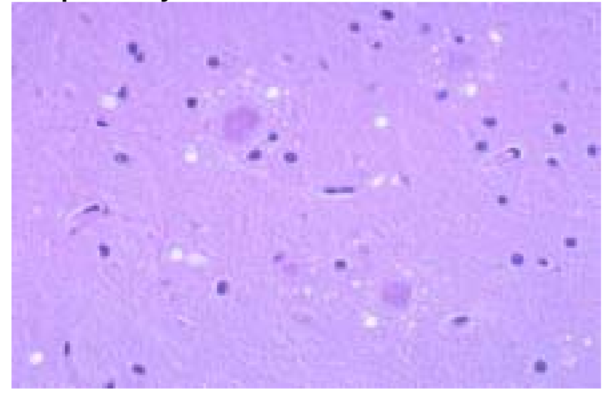
Les prions sont des agents infectieux de nature protéique responsables d'encéphalopathies spongiformes à incubation longue, caractérisée par atteinte du système nerveux central avec spongiose avec perte neuronale et gliose hyperastrocytaire sans réaction inflammatoire, associé à plaques amyloïdes. Les prions sont des agents transmissibles non conventionnels (ATNC) dénommés prion PrPres (''résistante'') ou PrPsc (*scrapie*) pour "*Proteinaceous infectious particle*" (protéine infectieuse).

Aspect spongieux du cerveau avec destruction neuronale (x 200)





Plaques amyloïdes





Bâtonnets de protéine prion polymérisée (microscope électronique).

Historique

Dès 1732, on observe la tremblante du mouton (*scrapie*) en Angleterre et France. En 1920-1921, Hans Creutzfeldt et Alfons Jakob décrivent la maladie qui porte leur nom. En 1936, Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle montrent que la scrapie du mouton est transmissible par des extraits de cerveau d'animal à animal, suggérant la nature infectieuse de la maladie. En 1957, Carleton Gajdusek et Vincent Zigas montrent que le kuru, maladie des tribus papoues proche de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, est transmissible par anthropophagie. En 1960, I. Patisson montre l'existence d'une barrière d'espèce pour la *scrapie*. En 1966-1967, T. Alper montre que l'agent infectieux résiste aux radiations et qu'il n'y a pas d'acides nucléiques dans le matériel infectieux. En 1982, Stanley Prusiner montre que l'agent infectieux est une protéine sans acides nucléiques. Par séquençage N-terminal de la protéine (1984-1985), il démontre que la protéine humaine est codée par un gène identifié comme le gène *prn-p* présent sur le chromosome 21 des sujets normaux et de fonction inconnue. En 1986, débute l'épidémie de maladie des vaches folles en Angleterre. En 1989, on découvre que la sensibilité au prion dépend du taux d'identité peptidique du prion avec celui de la protéine de l'espèce animale considérée par des expériences avec des souris transgéniques. En 1993, une preuve décisive du rôle de la

protéine prion est apportée par Prusiner montrant que les souris *knock-out* pour le gène sont viables et résistent à l'infection expérimentale par les prions. En 1996, on identifie un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob identique au prion de la maladie des vaches folles et transmis à l'homme par cette protéine bovine.

Les encéphalopathies spongiformes humaines

La maladie de Creutzfeldt-Jakob.
La maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) est une encéphalopathie spongiforme humaine la plus fréquente. Il existe plusieurs formes. Une forme sporadique atteignant des patients de >65 ans présentant une démence entraînant la mort en 6 mois. On dénombre 50 cas / an en France depuis plusieurs décennies (1 cas /10^6 h). Il existe aussi une forme familiale (5 cas / an en France) atteignant des patients de plus jeunes (40 ans) et présentant des altérations du gène *prnp* (insertions, mutations). Il existe aussi des formes iatrogènes secondaires à des interventions neurochirurgicales, ophtalmologiques et ORL (> 31 cas [dure-mère, électrodes, greffes de cornée et de tympan]), après traitement par l'hormone de croissance hypophysaire (76 cas France sur 968 patients exposés en 1985-1986, 15 cas aux USA, 16 cas en Grande-Bretagne), et après traitement par gonadotrophines hypophysaires (4 cas en Australie et Nouvelle-Zélande). La possibilité de transmission par transfusion est une crainte mais n'est pas pour le moment documenté chez l'homme. Enfin, la nouvelle forme de MCJ du jeune entre 20-40 ans (le plus jeune patient avait 13 ans) survient après une incubation inconnue (3-30 ans ?) et évolue en 14 mois avec un syndrome psychiatrique (hallucinations, schizophrénie), puis des troubles neurologiques (ataxie, troubles visuels, démence). On compte 113 cas en Angleterre 1994- 2001, 3 cas en France en 2001.

Le kuru.
Le kuru est une maladie très proche de la MCJ. Décrit en Nouvelle-Calédonie en 1950 chez les Fores (tribus papous), le kuru est caractérisée par une ataxie cérébelleuse progressive qui a entraîné environ 2500 décès entre 1957 et 1982. Cette maladie était associée à certains rites funéraires consistant à manger le cerveau des défunts. Elle frappait jusqu'à 10% de la population de certains villages, surtout les femmes et les enfants.

Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker et insomnie fatale familiale.

Ce sont deux maladies familiales très rares et transmissibles expérimentalement.

Les encéphalopathies spongiformes animales

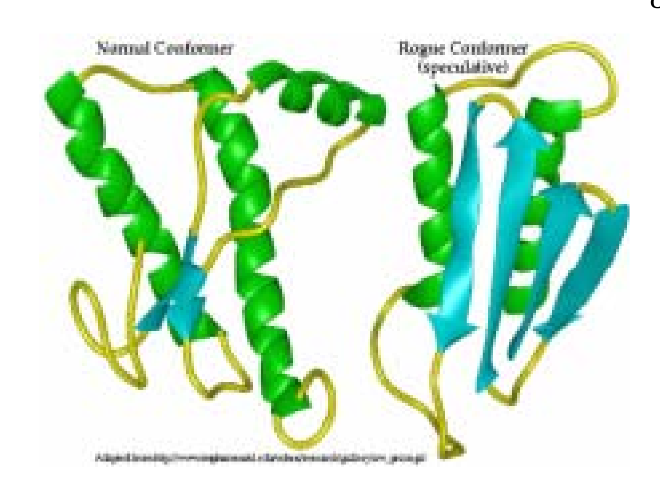
Il existe chez l'animal des encéphalopathies donnant des lésions du tissu cérébral très proches de la MCJ : la tremblante du mouton et l'encéphalopathie spongiforme bovine (maladie des vaches folles), plus rarement des encéphalopathies sporadiques transmissibles du vison, du chat et la maladie de dépérissement chronique des ruminants sauvages (caribou, élan).
La tremblante du mouton (*scrapie*) est une maladie connue en Angleterre et France depuis 1732. Atteignant les ovins et les caprins à âge 3-4 ans, elle a une incubation longue. Les signes cliniques sont des troubles du comportement, du prurit, une incoordination motrice, des tremblements, et la mort en 6 semaines-6 mois. Il existe des formes ataxiques, des formes prurigineuses et des formes paralytiques. Cette maladie est fréquente et peut atteindre jusqu'à 10 à 30% des troupeaux (> 100 bêtes). Il n'existe aucun argument pour incriminer une

transmission humaine de cette maladie. Cependant, on suspecte que la souche de prion bovin ait pu contaminer des moutons, ce qui pourraient exposer de façon inquiétante la population à la maladie.
La maladie des vaches folles était inconnue avant 1985. La maladie clinique survient après une incubation de 36 mois en moyenne et donne des troubles neurologiques proches de la *scrapie*.

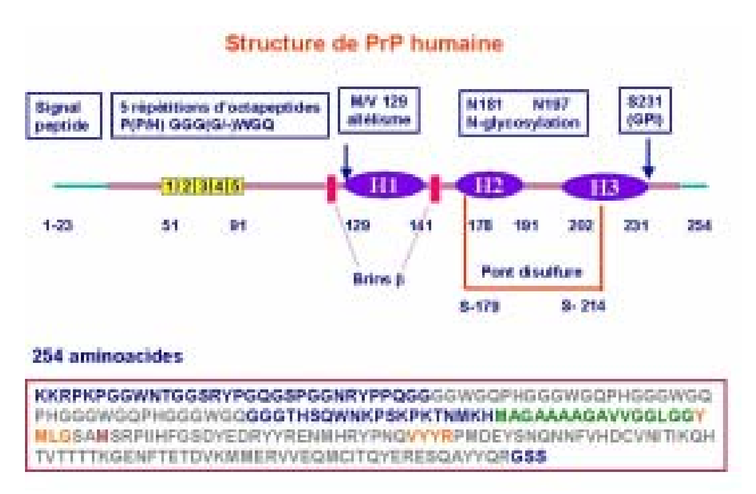
Caractéristiques des prions

La protéine prion

Le prion PrPres ou PrPsc est une protéine de 27-30 kDa (253 aa) avec plus de 85 % d'homologie avec autres PrP des animaux. C'est une protéine hydrophobe et résistante à la protéinase K, sans acides nucléiques détectables, capable de se polymériser en fibrilles, codée par le gène *prn-p* du chromosome 20 chez l'homme.
Cette protéine provient d'un changement conformationnel de la protéine normale PrP ou PrPc (cellulaire).
La protéine PrPc présente deux isoformes, la protéine normale PrPc (cellulaire) de 33-35 kDa , sensible à la protéinase K et la protéine prion PrPres ou PrPsc (résistante à la protéinase K) de 27-30 kDa résistante à la protéinase K. La structure tridimensionnelle de l'isoforme normale comporte 3 hélices α et l'isoforme pathologique seulement 2 hélices α et 4 feuillets ß.
La protéine PrPc est abondante dans le système nerveux central, le tissu lymphoïde et le tube digestif. C'est une glycoprotéine transmembranaire ancrée à la surface des cellules et endocytée. Sa fonction est inconnue. Elle aurait un rôle protecteur contre l'apoptose cellulaire, interviendrait dans la croissance axonale, et dans le transporteur de cuivre Cu^{2+} (internalisation du Cu^{2+} et protection contre le stress oxydatif).

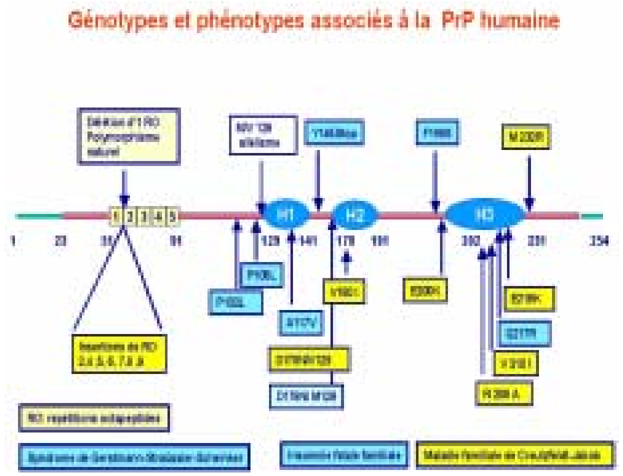


Conformation de la protéine PrP normale (gauche) et PrPsc (droite).



Structure de la PrP normale.

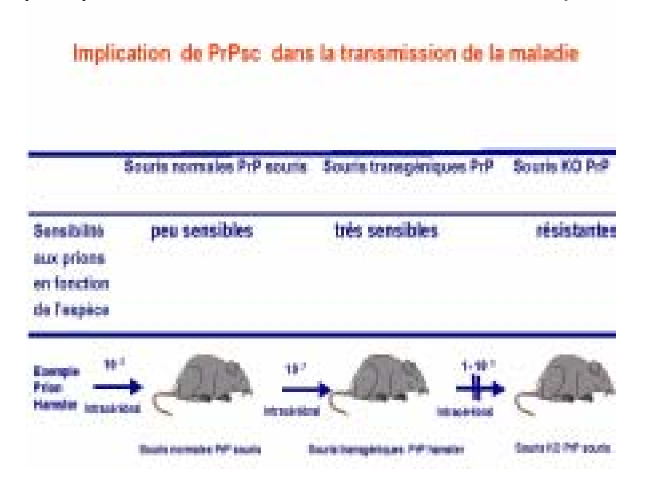
Les encéphalopathies spongiformes familiales (la forme familiale de MCJ, syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker et l'insomnie fatale familiale) sont associées à des anomalies de la séquence peptidique de la protéine PrP (mutations, insertions, délétions).



Anomalies de la PrP selon la maladie familale.

Résistance et infectiosité des prions

C'est une protéine très résistante aux enzymes protéolytiques, à la chaleur, aux rayons ionisants, à la plupart des antiseptiques (formol, glutaraldéhyde…). Sa résistance à la chaleur sèche (180°C - 24 h; >360°C - 1 h ; 600°C - 15 min), à la chaleur humide : 134°C-18 min, aux antiseptiques (soude 1 N , hypochlorite de sodium (1 h 20°C). La protéine PrPres est infectieuse : (1) les souris transgéniques du gène *prn-p* sont très sensibles au prion de la même espèce ; (2) les souris knock-out du gène *prn-p* sont totalement résistantes aux prions.



Physiopathologie de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Entrée et propagation au système lymphoïde

La MCJ du jeune se contracte par voie orale par l'alimentation (tissus cérébraux ou lymphoïdes de vaches infectés…). Les prions franchissent la barrière digestive et atteignent le tissu lymphoïde où ils s'amplifient (plaques de Peyer, GALT, rate…). Pendant cette phase asymptomatique de plusieurs années, les prions gagnent le système nerveux central (moelle, tronc cérébral, cerveau) par différentes voies : (1) voie nerveuse ascendante par les nerfs périphériques des ganglions lymphoïdes infectés et passage trans-synaptique possible, ou directement par les terminaisons nerveuses du plexus mésentérique (passage direct du tube digestif au système nerveux) ; (2) par voie sanguine par les cellules immunitaires ou les protéines plasmatiques (plasminogène) à travers la barrière hémo-encéphalique.

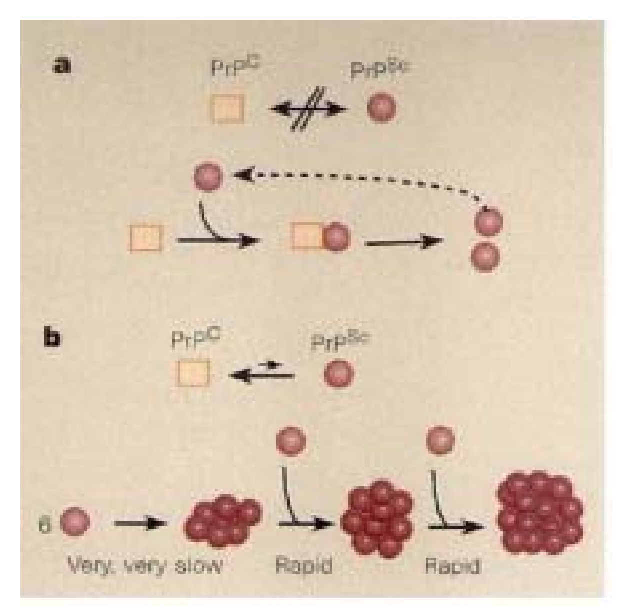
Infection du système nerveux central

système nerveux central (moelle, tronc cérébral, cerveau), la protéine PrPsc s'accumule dans les neurones induisant une apoptose neuronale et une activation des cellules microgliales produisant des facteurs neurotoxiques associée à une gliose hyperastrocytaire. Il n'y a pas de réponse immunitaire inflammatoire, ce qui est caractérise les encéphalopathies spongiformes. La mort neuronale progressive entraîne l'aspect spongieux du cerveau et l'accumulation de plaques amyloïdes constituées de PrPsc. Il n'existe pour l'instant aucun traitement de cette maladie.

Transconformation de la PrPsc

On sait que, après absorption d'une très faible quantité de PrPsc , des quantités

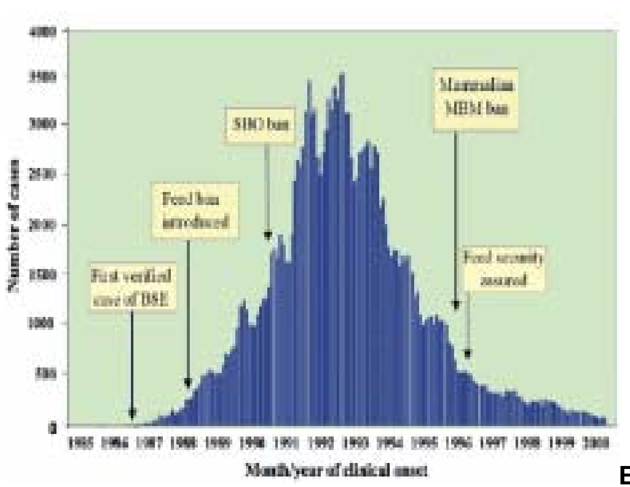
importantes de prions s'accumulent dans les neurones. Cette PrPsc provient presqu'exclusivement de la PrP normale des patients. La transconformation est le résultat d'une interaction protéine-protéine qui entraîne le changement de conformation. Il existe 2 théories de la transconformation, un modèle catalytique (A) et un modèle par nucléation (B).



Les 2 modèles de transconformation.

Epidémiologie de la *scrapie* et de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

La *scrapie* est une maladie des ovins et des caprins très fréquente, qui peut atteindre jusqu'à 10 à 30% des troupeaux (>100 bêtes) de moutons dans certaines régions. Il n'existe aucun argument pour incriminer une transmission humaine de cette maladie. Cependant, on suspecte que des moutons exposés aux farines animales aient pu être contaminés par le prion bovin qui, elle, est transmissible à l'homme.



Evolution de l'épidémie de la maladie des la vache folle (1985-2000)

Le premier cas de maladie des vaches folles a été signalé en Angleterre en avril 1985. Aujourd'hui, cette maladie a décimé les troupeaux de bovins dans ce pays et avec plus de 180 000 bovins et une extension à de nombreux autres pays.



Après l'interdiction des farines animales en juillet 1988 pour les bovins, la maladie a continué de se propager en Angleterre, atteignant son acmé en 1993 avec 35755 cas annuels. Cette propagation est généralement attribuée à l'évolution spontanée d'une maladie à incubation longue, et peut-être au non-respect de l'interdiction par

certains éleveurs. Depuis 1993, l'épidémie a progressivement décliné pour atteindre aujourd'hui moins de mille cas annuels en Angleterre. En France et dans le reste de l'Europe, le nombre de cas atteignant les bovins est resté limité à quelques dizaines entre 1990 et 1998.
Au cours de la maladie des vaches folles, le tissu lymphoïde est infectieux pendant l'incubation : dès le 6ème mois, l'iléon, puis le thymus, la rate et la moelle osseuse. Les tissus nerveux (moelle, tronc cérébral, cerveau) sont contaminés à partir du 30ème - 32ème mois.
L'origine de cette épidémie est liée à l'alimentation par les farines animales fabriquées à partir des carcasses animales. A partir des années 80, un changement des modes de fabrication de ces farines a permis la contamination par les prions d'animaux malades, peut-être d'ovins atteints de *scrapie* ou de bovins atteints d'une forme sporadique jamais décrite. Il est possible qu'une souche particulière de scrapie puisse être à l'origine de l'épidémie des vaches folles du fait de sa capacité de franchir facilement la barrière des espèces.

Bilan de l' épidémie des vaches folles

31 décembre 2000

- Angleterre 180 376 cas (1986-2000) dont 40 000 animaux infectés en Angleterre après l'interdiction des farines (1996) et 11.5 millions de bovins)
- France 150 cas (20 millions de bovins) 31/12/2000
  350 cas juillet 2001
- Irlande 487 cas
- Portugal 446 cas
- Suisse 363 cas
- Belgique 18 cas
- Hollande 6 cas
- Allemagne 3 cas
- Danemark Luxembourg Liechtenstein 4 cas

Epidémiologie de la maladie de Creutzfedt-Jakob

Sensibilité génétique

On a montré qu'il existe une sensibilité génétique particulière à la maladie de Creutzfeldt-Jakob en fonction du polymorphisme du gène *prn-p*. Il existe un polymorphisme de la protéine PrPc (253 aa) dans la population, notamment au codon 129 qui code soit une méthionine (Met) , soit une valine (Val) : on dénombre 40% d' homozygotes Met/Met, 10% d'homozygotes Val/Val, et 50% d'hétérozygotes Val/Met. Les homozygotes Met/ Met sont plus sensibles à la maladie. En effet, les patients atteints de MCJ sporadique sont homozygotes Met/Met à 70%, homozygotes Val/Val à 15%, et hétérozygotes Val/Met à 15% . Lors de la MCJ iatrogène, 95 % des patients sont homozygotes et seulement 5 % sont hétérozygotes. Pour la MCJ due au nouveau variant, on dénombre 100% de génotype Met/Met chez les patients.

Transmission horizontale

La maladie n'est pas contagieuse par contact direct (interhumain, sexuel…). La maladie est transmise par ingestion de tissus infectés de bovins : tissu lymphoïde, moelle osseuse, cerveau. On ne peut démontrer expérimentalement une infectiosité pour les muscles et le lait (mais attention aux animaux présentant des signes de la maladie qui ont des prions dans le sang). Les ovins infectés par le nouveau variant sont dangereux pour l'homme, alors que la *scrapie* est considérée comme non transmissible à l'homme. Il pourrait exister un risque transfusionnel, non documenté chez l'homme, mais mis en évidence expérimentalement chez des moutons infecté par le nouveau variant avec du sang provenant de la phase d'incubation de la maladie. Il faut donc être très vigilant sur les donneurs de sang et chez les patients polytransfusés et hémophiles.

La transmission verticale

On n'a jamais pu démontré que le lait soit infectieux. Dans l'expérience du kuru, il a été rapporté que, parmi les 600 femmes allaitant

en incubation ou prodromes de la maladie , aucune n'a transmis la maladie. En revanche, le colostrum chez les bovins peut être infectieux chez les animaux malades qui mettent bas. Le placenta n'est pas infectieux (sauf chez les animaux malades). Il faut rappeler la faible placentophagie des bovins.

Diagnostic biologique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Le diagnostic biologique de la MCJ est essentiellement anatomo-pathologique. Par biopsie cérébrale ou par prélèvement de cerveau à l'autopsie, les signes anatomopathologiques caractéristiques sont mis au jour : aspect spongieux du tissu cérébral, perte neuronale, plaques amyloïdes, gliose hyperastrocytaire, sans réaction inflammatoire

Il existe un test diagnostique (Western-blot et ELISA) permettant de détecter la protéine prion dans les tissus cérébraux suspects. On montre qu'un anticorps monoclonal contre la protéine reconnaît la protéine prion dans les extraits de cerveau après traitement par la protéinase K qui détruit la protéine normale. La ponction lombaire peut monter la présence dans le LCR d'un marqueur non spécifique de destruction du tissu cérébral, la protéine 14-3-3. D'autres tests diagnostiques sont à l'étude pour détecter PrPsc dans le sang et l'urine.

Les prions : une révolution et une énigme

Une révolution conceptuelle

On a longtemps pensé qu'un gène codait pour une seule protéine ayant des propriétés bien définies. La découverte des prions nous apprend qu'un même gène peut coder pour plusieurs formes de protéines selon leur conformation tridimentionnelle. De plus, cette découverte montre qu'une maladie peut être liée à un changement de conformation d'une protéine. Ceci pourrait ne pas être un exception mais fait poser la question de savoir si d'autres maladies, en particulier neurodégénératives comme les maladies d' Alzheimer et de Hungtinton…, pourraient procéder d'un mécanisme similaire.

Une énigme

La protéine infectieuse agit-elle seule ? Le fait qu'existent différentes souches d'un même prion chez les ovins, par exemple, incite à croire que pourrait exister d'autres facteurs agissant avec cette protéine pour expliquer la maladie. Ceci est mis en évidence par transmission de PrPsc à des souris de même fond génétique, permettant de voir des différences dans la période d'incubation et dans les lésions anatomopathologiques du cerveau. On a proposé que la protéine infectieuse soit associée à une autre protéine chaperon (protéine X), ou même à un acide nucléique ‘' caché'' et protégé par la protéine très résistante.

Quel avenir ?

De nombreux problèmes demeurent concernant les risques de transmission et de dissémination à l'homme de la maladie des vaches folles, à savoir la possibilité de transmission par le sang pour les concentrés sanguins provenant de sujets en incubation de la MCJ (incubation qui peut durer plusieurs années), ou les dangers éventuels de la consommation de viande de boeuf, d'abats ou de produits dérivés d'animaux malades ou en incubation.

La nouvelle forme de maladie de Creutzfeldt-Jakob chez le sujet jeune pose de nombreux problèmes. Si la maladie est transmise par la nourriture à partir de la viande de bœuf, pourquoi atteint-elle de préférence les sujets jeunes, pourquoi ne se répartit-elle pas de façon régulière dans l'ensemble de la population ? pourquoi n'est-elle pas plus fréquente chez certains sujets professionnellement exposés, dans les abattoirs par exemple ? Les sujets jeunes

ont-ils un facteur de risque particulier, comme par exemple une consommation particulière de certaines nourritures contenant des hauts titres de l'agent infectieux ? L'avenir reste incertain.

Bilan de MCJ (nouveau variant)

Années	nombre de cas de vCJD	
1995	3	
1996	10	
1997	10	
1998	15	
1999	18	
2000	28	
2001	18	
2002	12	Aout 2002
Total	125	

Evolution des cas de MCJ (nouveau variant).

